

# Imagerie non linéaire de second harmonique appliquée à la caractérisation de tissus végétaux

Etienne BELIN<sup>(1)</sup>, Denis GINDRE<sup>(2)</sup>, Didier DEMILLY<sup>(3)</sup>, François CHAPEAU-BLONDEAU<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire Angevin de Recherche en Ingénierie des Systèmes (LARIS), Université d'Angers, 62 avenue Notre Dame du Lac, 49000 Angers, France.

(2) Université d'Angers, CNRS UMR 6200, Laboratoire MOLTECH-Anjou, 2 boulevard Lavoisier, 49000 Angers, France.

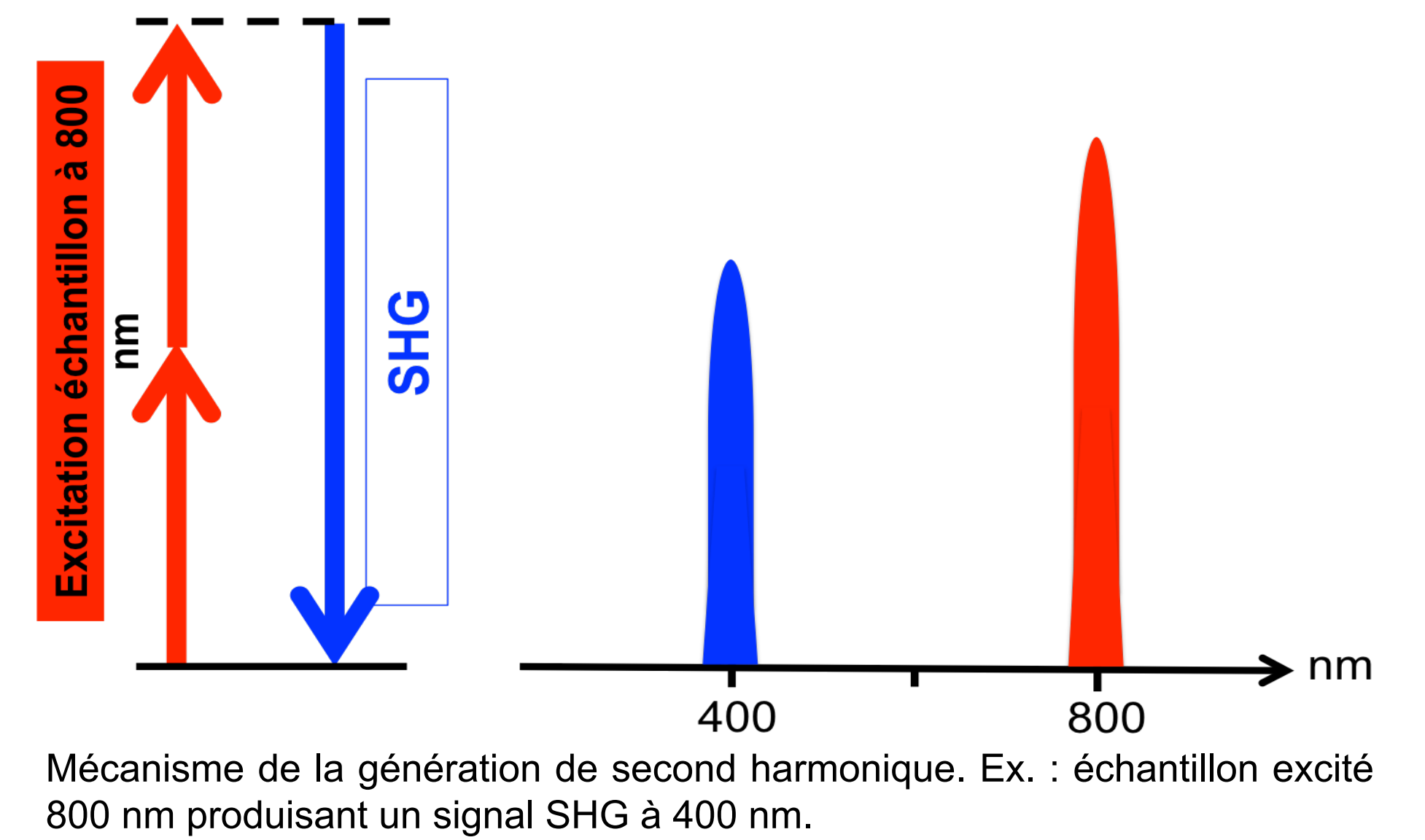
(3) GEVES, Station Nationale d'Essais de Semences (SNES), 25 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé, France.

Ce travail a bénéficié d'une aide de l'État gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du programme « Investissements d'Avenir » sous la référence ANR-11-BTBR-0007 (programme AKER).

## Imagerie non linéaire de génération de second harmonique (SHG)

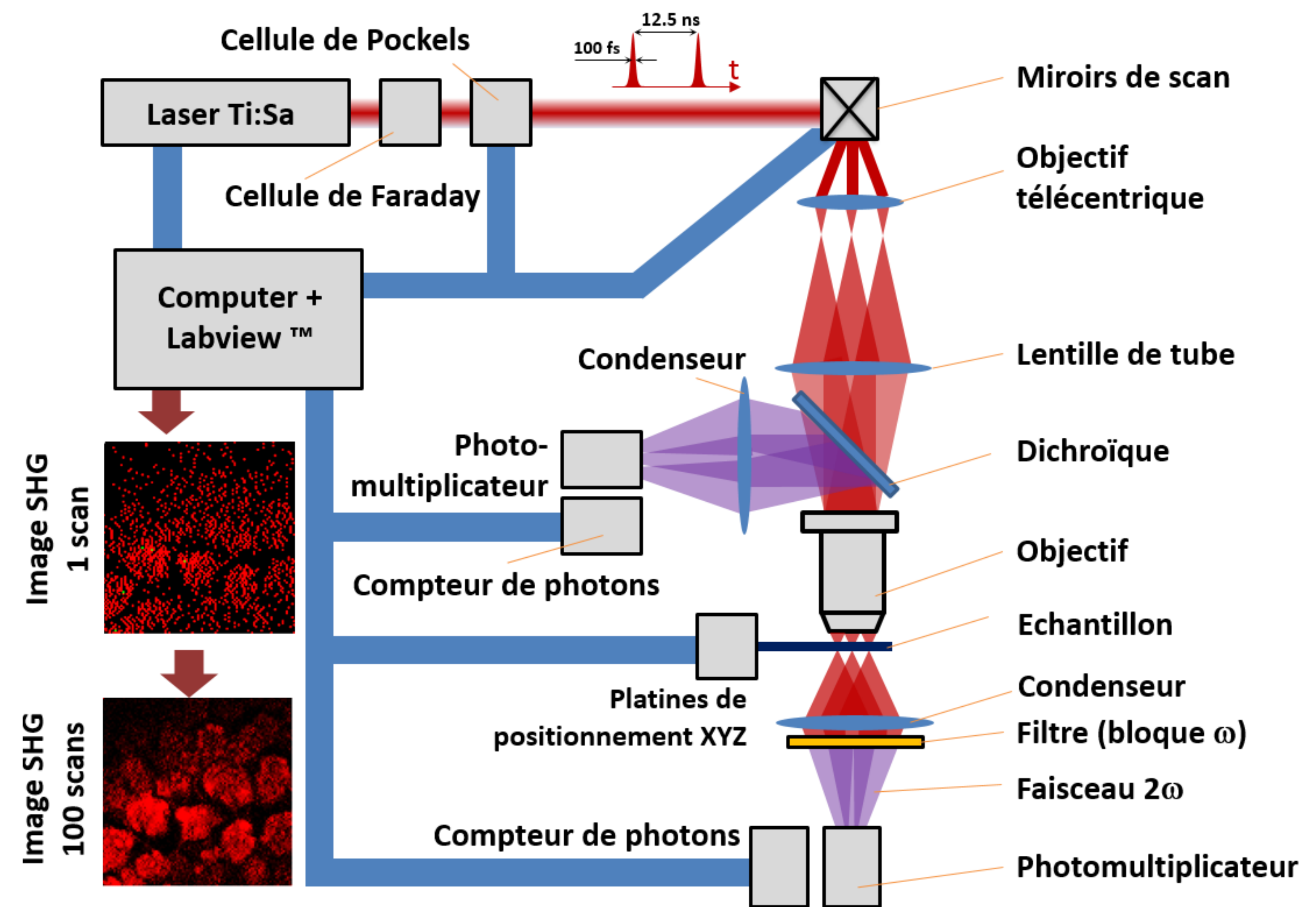
### Principe

- Imagerie par microscopie non linéaire :
  - ✓ interaction à 2 photons au sein d'un milieu [1],
  - ✓ complémentaire à imagerie fluorescence.
- Molécules du milieu : **absorption de 2 photons basse fréquence → émission 1 photon fréquence double.**
- Réponse optique spécifique des constituants "harmonophores" naturel du milieu :
  - ✓ principalement science médicale : collagène fibrillaire [2-3],
  - ✓ biologie végétale : chloroplaste [4] + amidon [5].



### Montage expérimental

- Laser Titane-Saphir femtoseconde accordable ( $\lambda = 800$  nm) :
  - ✓ modulation d'intensité par effet électro-optique Pockels,
  - ✓ balayage par miroirs oscillants,
  - ✓ positionnement motorisé de l'échantillon.
- Détection signal SHG en transmission et en réflexion :
  - ✓ filtre passe-bande centré 400 nm (largeur 50 nm),
  - ✓ miroir dichroïque (réflexion) et passe-bas (transmission) pour éliminer les photons à 800 nm,
  - ✓ photomultiplicateur rapide couplé à compteur de photons (Hamamatsu).
- Construction d'une image SHG photon par photon.
- Exemple : **image 100x100 pixels avec 100 balayages et pixeltime = 10  $\mu$ s → temps d'acquisition = 10 secondes.**



## Application à des semences végétales

Au sein d'une semence : 2 organes essentiels

- embryon** : division cellulaire → plante adulte,
- réserve d'amidon** → ressources énergétiques pour le développement de la plante.

Mesure SHG pour une caractérisation du contenu en amidon :

- **pronostic de la croissance de la plante,**
- **différentiation selon les génotypes.**

Application sur **betterave sucrière** (Référence AWP4-1306 du programme AKER)

En particulier : selon la polarisation du rayonnement incident [6] →

- localisation,
- orientation cristalline dans les grains d'amidon.

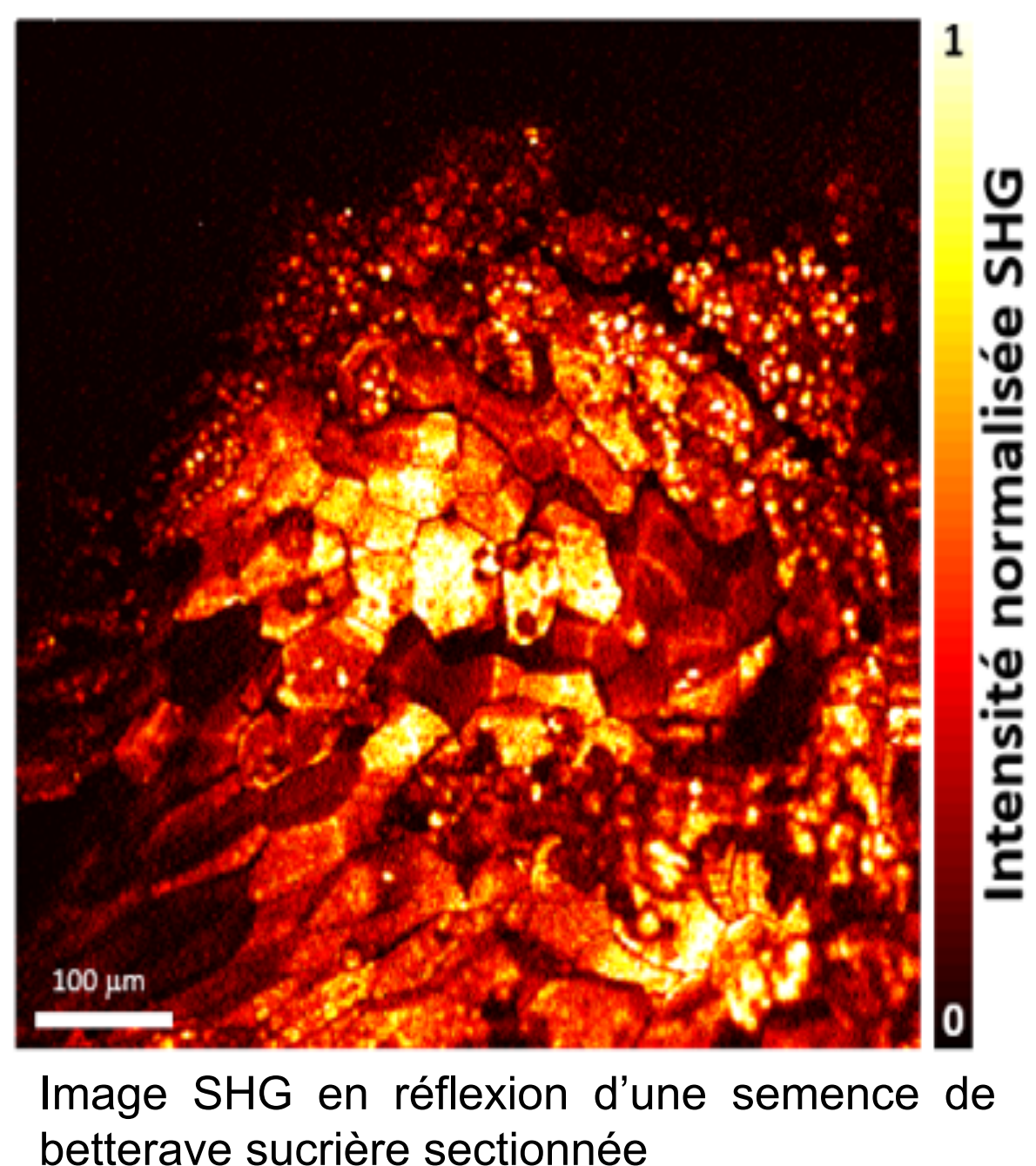
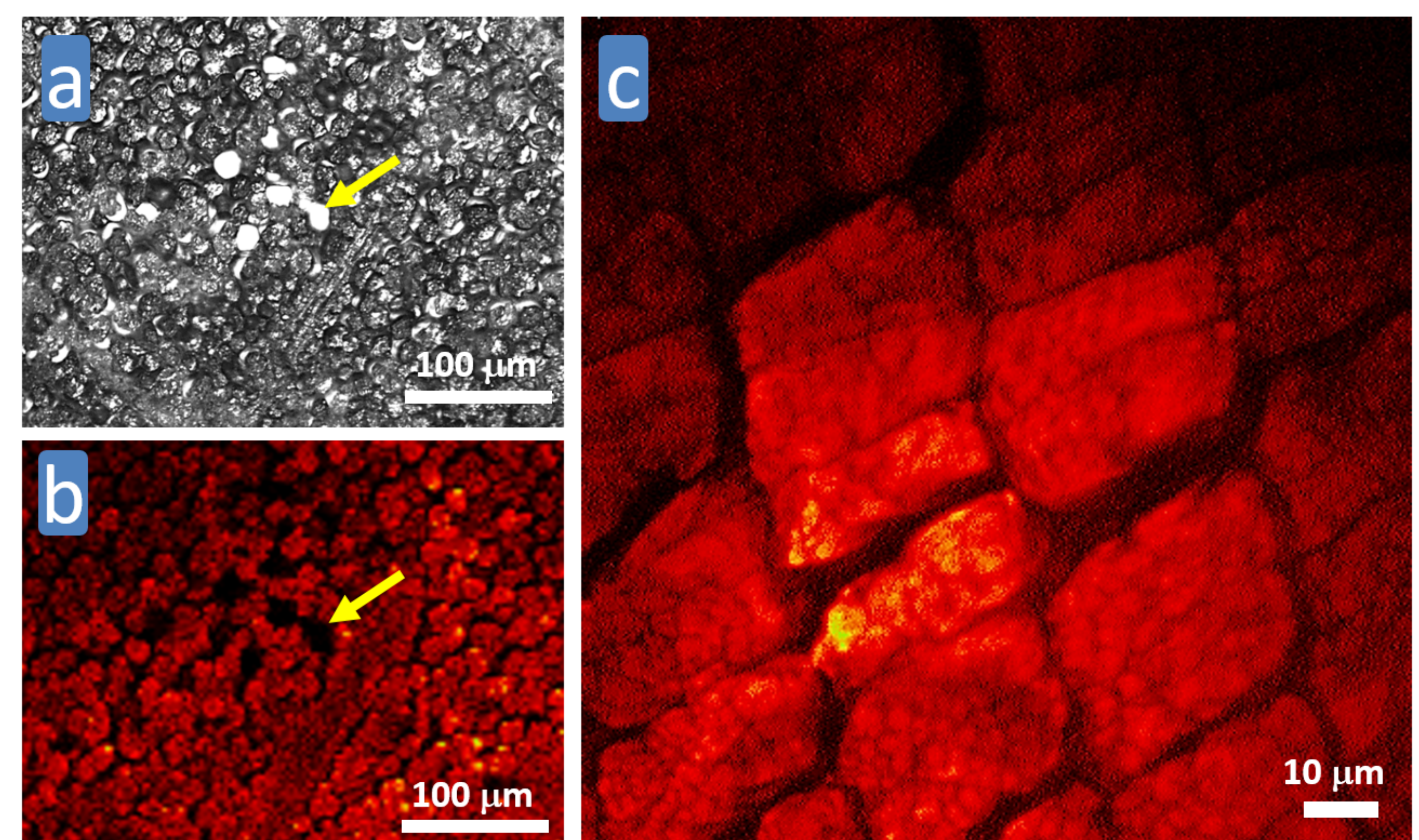
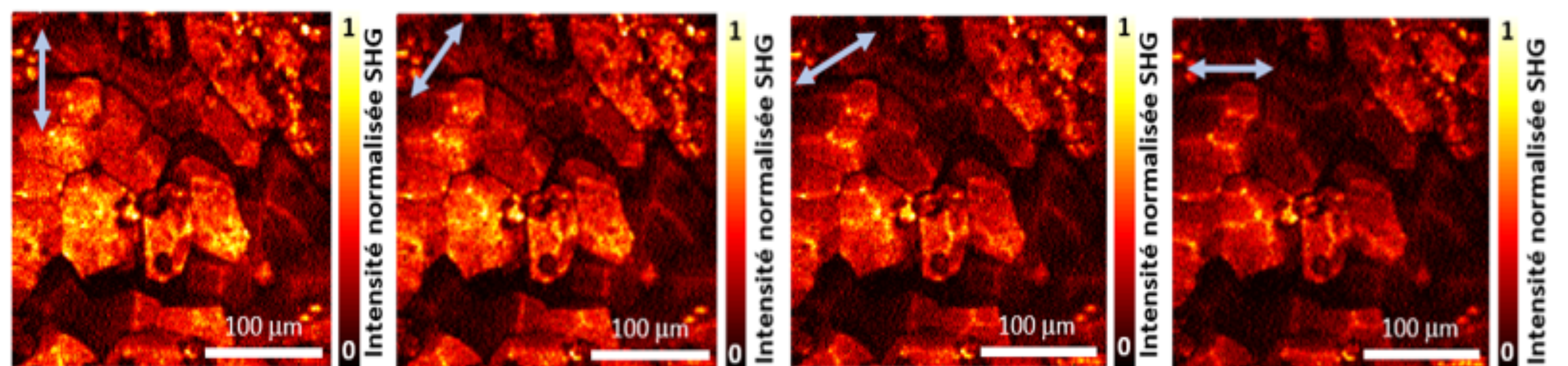


Image SHG en réflexion d'une semence de betterave sucrière sectionnée

Évolution du contraste SHG en fonction de la polarisation du laser (schématisée par les flèches en haut à gauche de chaque image)

Image optique (a) et SHG (b) en réflexion d'une semence de betterave sucrière (coupe histologique 10  $\mu$ m) obtenue avec objectif X10. (c) détail SHG sur quelques grains d'amidon obtenu avec objectif X60 ON=1,2. Une structuration du grain d'amidon à l'échelle submicrométrique est nettement visible.[1] P. J. Campagnola, L. M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms", *Nature Biotechnology*, vol. 21, pp. 1356–1360, 2003.[2] R. M. Williams, W. R. Zipfel, W. W. Webb, "Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils", *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 1377–1386, 2005.[3] J. M. Lemée, A. Clavreul, S. Rakotoarimalala, D. Gindre, P. Menei, "Analysis of glioblastoma's peritumoral brain zone using biphotonic microscopy", *Neuro Oncology*, vol. 16, pp. ii82–ii83, 2014.[4] A. H. Reshak, C. R. Sheue, "Second harmonic generation imaging of the deep shade plant *Selaginella erythropus* using multifunctional two-photon laser scanning microscopy", *Journal of Microscopy*, vol. 248, pp. 234–244, 2012.[5] R. Carriles, K. E. Sheetz, E. E. Hoover, J. A. Squier, V. Barzda, "Simultaneous multifocal, multiphoton, photon counting microscopy", *Optics Express*, vol. 16, pp. 10364–10371, 2008.[6] G. Cox, N. Moreno, J. Feijo, "Second-harmonic imaging of plant polysaccharides", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, pp. 024013–0240136, 2005.