La microscopie optique tridimensionnelle, de l'imagerie biomédicale à la caractérisation des objets du patrimoine

Gaël Latour[1,2], Laurianne Robinet[3]

[1] Laboratoire « Imagerie et modélisation en neurobiologie et cancérologie », Université Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France

[2] Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, CNRS, INSERM, Palaiseau, France

[3] Centre de Recherche sur la Conservation (CRC), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Ministère de la Culture, 36 rue Geoffroy Saint Hilaire, 75005 Paris, France

1 La microscopie optique dans le contexte de l'imagerie biomédicale

L'imagerie biomédicale vise à observer et caractériser les différents tissus humains afin de permettre un diagnostic chez le patient ou de suivre l'effet d'un traitement. De nombreuses modalités d'imagerie sont désormais accessibles, chacune basée sur des modes de contraste distincts. Ces techniques sont généralement complémentaires et le médecin a généralement recours à plusieurs d'entre elles pour effectuer un diagnostic complet. On peut citer les techniques basées sur des rayonnements électromagnétiques telles la radiographie qui permet d'obtenir une imagerie bidimensionnelle qui renseigne sur la densité des tissus et le scanner X qui élargit à une reconstruction tridimensionnelle grâce à différents angles d'observation. L'échographie a quant à elle recours à des ultrasons. Cette technique repose sur la mesure du temps de parcours des ondes acoustiques dans le corps humain pour effectuer un aller-retour. Le contraste des images est donc lié aux propriétés mécaniques des tissus. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet la visualisation des tissus mous. L'interaction des protons du corps humain avec le champ magnétique donne accès à une cartographie de la densité des tissus. Enfin, la scintigraphie et la tomographie par émission de positons (TEP) repose sur la détection et le suivi de traceurs radioactifs. L'ensemble de ces techniques d'imagerie sont largement répandues dans le domaine médical et permettent le

diagnostic de nombreuses pathologies. Toutefois, si certaines d'entre elles permettent d'accéder à l'imagerie d'organes entiers, leurs résolutions spatiales sont généralement limitées. En effet, en imagerie, il existe généralement un compromis entre la résolution des images obtenues et la profondeur de pénétration (Figure 1). Ainsi, ces techniques ne permettent pas d'observer et de caractériser la structure subcellulaire des tissus, c'est-à-dire à l'échelle du micromètre.

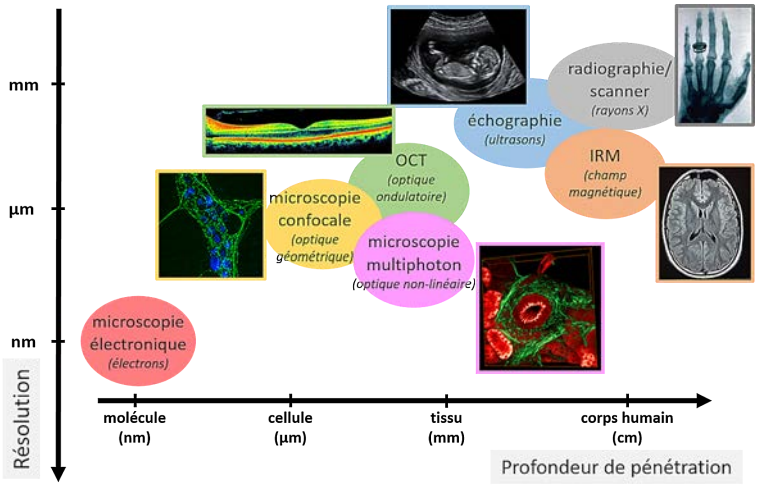


FIGURE 1 – Comparaison des techniques d'imagerie les plus courantes présentes dans le domaine biomédical. Le schéma représente les caractéristiques de ces techniques du point de vue de leurs résolutions spatiales et de leurs profondeurs de pénétration.

L'objet de la microscopie est ainsi complémentaire des techniques précédentes. Il s'agit de l'observation de « petits » objets, trop petits pour être observés à l'œil nu. La notion de « petit » sera quantifiée précisément par la suite, elle est liée à ce que l'on appelle la résolution du système d'imagerie qui est la capacité à séparer spatialement deux objets distincts. La microscopie optique repose sur l'utilisation de la lumière visible comme source d'illumination, généralement étendue du proche ultraviolet au proche infrarouge. Or, les tissus biologiques sont à la fois absorbants, absorption majoritairement liée à la présence d'eau et d'hémoglobine, et diffusants dans ce domaine spectral. La profondeur de pénétration est donc relativement faible, limitant ainsi les applications médicales. La microscopie optique conventionnelle peut donc être utilisée en dermatologie pour un examen des couches superficielles de la peau ou en ophtalmologie pour l'observation de la cornée. La seule technique optique utilisée pour un examen en profondeur dans le corps humain est la tomographie par cohérence optique (*optical coherence tomography*, OCT) [1,2] utilisée en ophtalmologie pour l'imagerie de la cornée et surtout de la rétine. L'œil est en effet transparent aux longueurs d'onde visible, propriété indispensable à son bon fonctionnement du point de vue physiologique, ce qui explique les développements en optique dans ce domaine. Par ailleurs, les microscopes optiques sont également largement présents dans les services et laboratoires d'anatomo-pathologie où les observations se font sur des coupes fines de tissus issues de biopsies. Toutefois, les avancées technologiques et les nombreux

travaux de recherche sur le développement de sondes endoscopiques permettent de réaliser un diagnostic optique et d'envisager son application a davantage d'organes à moyen terme. Si ces applications dans le domaine médical sont encore limitées, l'utilisation des techniques de microscopie optique pour la recherche biomédicale est largement répandue pour accéder à une meilleure compréhension de la structure et du fonctionnement à l'échelle cellulaire ou subcellulaire. Ainsi, les laboratoires de recherche cherchent à optimiser ces techniques ou développer de nouvelles modalités d'imagerie optique. Le principal intérêt des techniques optiques est l'observation sans contact et non invasive des échantillons qui permet une observation *in vivo*.

Les objets du patrimoine présentent de nombreux points communs avec les tissus biologiques quand ils ne sont pas directement issus de tissus biologiques. Ces objets sont riches de nombreux effets visuels (brillance et couleur) dans le domaine visible. Leurs propriétés d'absorption et de diffusion sont ainsi très proches de celles des tissus biologiques. Dans le même temps, les structures d'intérêt (épaisseur des couches, charges, morphologie) sont généralement de l'ordre de grandeur du micromètre. Enfin, les caractères non invasif et non destructif sont évidemment des atouts pour l'analyse de ces objets souvent uniques et fragiles. Ainsi, depuis quelques années les techniques de microscopie optique sont en plein essor dans ce domaine. Les technologies optiques permettent depuis une vingtaine d'années de dépasser l'observation bidimensionnelle (2D) via la microscopie optique conventionnelle pour accéder à une observation tridimensionnelle (3D) des objets permettant ainsi d'accéder à une stratigraphie virtuelle.

2 Principe des techniques de microscopie optique tridimensionnelle

En microscopie optique, la résolution des images est de l'ordre du micromètre (échelle subcellulaire) et elle est ainsi bien meilleure que celles des techniques conventionnelles d'imagerie médicale. En effet, cette résolution est liée à la limite de diffraction, de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de la source d'illumination. Elle peut ainsi atteindre quelques centaines de nanomètres. Toutefois, le plan d'observation est limité au plan de coupe au moment de la préparation de l'échantillon. Or, l'observation bidimensionnelle (2D) par microscopie optique des objets ne permet d'accéder qu'à une connaissance partielle de la structure et de l'organisation du tissu. Différentes stratégies en microscopie optique ont donc été développées afin d'accéder à la troisième dimension.

La microscopie confocale est sans doute la technique la plus répandue aujourd'hui pour la caractérisation tridimensionnelle (3D) des systèmes biologiques ou des tissus. Elle est basée sur une sélection spatiale de la lumière, en conjuguant optiquement le plan d'imagerie, où le signal est collecté par une caméra 2D, avec le plan d'observation. Cette technique permet ainsi de s'affranchir de la lumière provenant des plans en amont ou en aval du plan d'observation. On parle dans ce cas de « coupe optique » réalisée par le microscope, étant entendu que cette coupe optique est virtuelle et provient uniquement de cette sélection spatiale de la lumière. Cette technique présente l'inconvénient de ne pas pénétrer très profondément dans les milieux diffusants, ce qui limite son usage pour les tissus biologiques ou les échantillons épais. Ainsi, paral-

lèlement, deux autres techniques se sont développées : la tomographie par cohérence optique (OCT), basée sur une sélection temporelle de la lumière, et la microscopie optique non linéaire, également appelée microscopie multiphoton, basée sur une interaction qualifiée de non linéaire entre la lumière incidente et l'objet d'étude. Pour ces deux techniques, les premières publications datent des années 1990 [3,4] et les premières utilisations pour des applications dans le domaine du patrimoine ont été mentionnées une quinzaine d'années plus tard [5-10].

2.1 La tomographie par cohérence optique (OCT)

Une analogie avec l'échographie ultrasonore permet de comprendre le principe de l'OCT [1,2]. Dans le cas de l'échographie, la sonde échographique jour le rôle d'émetteur et de récepteur des ondes ultrasonores. Le temps de propagation dans le corps humain entre l'émission et la réception de l'onde est mesuré et, connaissant la vitesse de propagation de cette onde dans le milieu, il est possible d'en déduire la position spatiale des interfaces, en l'occurrence la profondeur. Pour l'imagerie optique, du fait de la vitesse de propagation de la lumière, il n'est pas possible d'un point de vue technologique d'avoir des électroniques simples qui mesurent le temps d'aller-retour de la lumière sur une distance de quelques millimètres. Par contre, il est possible de profiter des propriétés ondulatoires de la lumière pour mesurer des distances au sein d'un échantillon en ayant recours à l'interférométrie, ce qui équivaut à réaliser une sélection temporelle de la lumière.

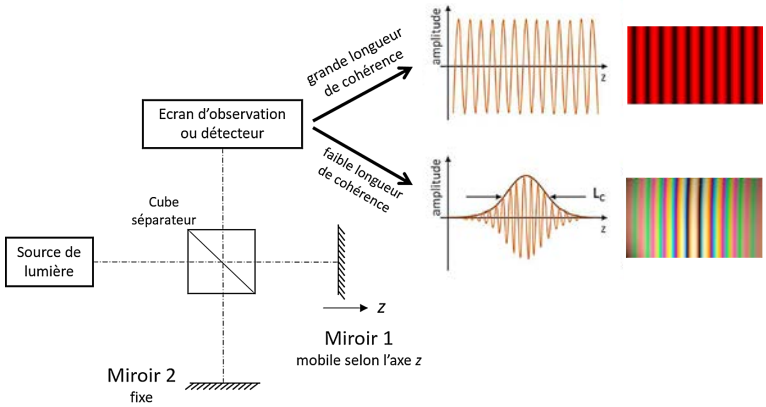


FIGURE 2 – Schéma optique de principe de l'OCT : un interféromètre de Michelson. En fonction de la nature de la source utilisée, l'interférogramme peut être très étalé (source monochromatique, ce qui correspond à une source fortement cohérente au niveau temporel) ou à l'inverse localisé (source polychromatique, c'est à dire faiblement cohérente).

Du point de vue de la conception optique, le montage à la base d'un système d'imagerie OCT est un interféromètre de Michelson. Il s'agit d'un montage optique où la lumière issue d'une source est séparée dans deux bras orthogonaux (Figure 2). Dans le cas où un miroir est placé à l'extrémité de chaque bras, les deux ondes peuvent donner lieu à une figure d'interférences. Il s'agit d'un motif où l'intensité lumineuse est parfois amplifiée (interférences constructives) ou atténuée (interférences destructives),

d'où une succession de franges brillantes et sombres. La largeur de l'interférogramme, c'est-à-dire son étalement spatial, est liée aux propriétés de cohérence temporelle de la source lumineuse (Figure 2). Dans notre cas, le choix se porte vers une source faiblement cohérente au niveau temporel (d'où le nom de la technique), ce qui permet d'avoir un interférogramme très peu étalé. Pour caractériser un échantillon, ce dernier remplace le miroir dans l'un des bras (le bras échantillon, en opposition au bras de référence qui contient le miroir de référence, Figure 3). Ainsi, toute interface ou objet diffusant au sein de l'échantillon donnera lieu à un interférogramme, ce qui permet de déterminer la structure en profondeur de l'échantillon étudié.

D'un point de vue optique, on peut noter que l'origine du signal dans les images obtenues par cette technique provient d'une variation de l'indice de réfraction dans le milieu étudié (interface entre deux milieux ou particules diffusantes). Le contraste des images est ainsi lié aux propriétés de réflectance de l'échantillon étudié.

Il existe deux types de technologie au niveau des systèmes d'imagerie OCT : le domaine fréquentiel et le domaine temporel. Dans le premier cas, le miroir de référence est fixe et c'est la transformée de Fourier du signal obtenu, à savoir l'interférogramme, qui permet de remonter à la structure en profondeur de l'échantillon. Cette configuration présente une grande stabilité mécanique et a donné lieu à de nombreuses optimisations industrielles tant du point de vue optique que de celui du traitement des données. Cette configuration est utilisée pour tous les dispositifs commerciaux d'imagerie dans le domaine biomédical. La résolution axiale de ce dispositif peut atteindre le micromètre, mais la résolution latérale est un peu moins bonne (entre 5 et 15 µm).

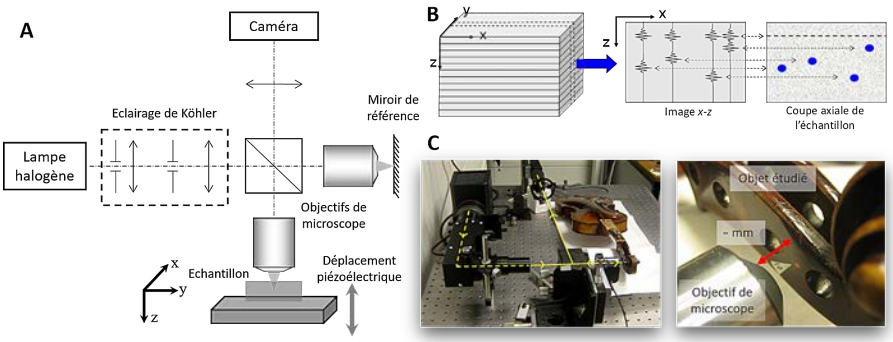


Figure 3 – Principe de l'OCT plein champ. (A) Schéma optique de l'OCT plein champ. (B) Au sein du volume de données acquises, chaque interférogramme enregistré en fonction de la profondeur correspond à une interface entre deux milieux ou à des structures diffusantes au sein de l'échantillon. (C) Photos d'un OCT plein champ utilisé pour l'analyse d'un vernis de violon (INSP, UPMC).

Une alternative est l'OCT dans le domaine temporel et plus précisément la configuration appelée OCT plein champ (Figure 3) [2]. L'échantillon est sondé en profondeur en faisant varier la longueur de l'un des bras de l'interféromètre. De plus, afin d'optimiser le temps d'acquisition, l'enregistrement des images se fait directement avec une caméra, d'où l'appellation « plein champ » de cette configuration. Les interfaces sont dans ce cas directement repérées à partir de l'enveloppe des interférogrammes

(Figure 3B). Cette technique est moins rapide que la première, mais les résolutions spatiales sont optimisées. Le principal avantage de cette configuration est la possibilité d'atteindre une résolution homogène dans les trois directions de l'ordre du micromètre.

Quelle que soit la configuration retenue (OCT dans le domaine fréquentiel ou plein champ), la source du contraste est liée aux propriétés de réflectance de l'échantillon. Il est donc possible d'obtenir une information structurale, interfaces ou structures diffusantes, mais aucune spécificité permettant d'envisager l'identification ou la discrimination des matériaux constitutifs.

2.2 La microscopie optique non linéaire ou microscopie multiphoton

La microscopie optique non linéaire repose sur l'interaction non linéaire entre la lumière et l'échantillon. Cette interaction est ainsi qualifiée car plusieurs photons incidents interagissent avec le milieu pour donner lieu à un seul photon émis. Ce phénomène étant peu probable, il ne se produit que très localement au niveau du volume focal, ce qui garantit un sectionnement optique intrinsèque.

La fluorescence excitée à deux photons (*two-photon excited fluorescence*, 2PEF) est basée sur l'absorption simultanée de deux photons qui excitent les molécules fluorescentes dans un premier temps, puis sur l'émission d'un photon dans un second temps. Elle se distingue ainsi de la fluorescence conventionnelle où un photon est absorbé puis réémis avec une énergie plus faible, c'est-à-dire une longueur d'onde plus élevée (Figure 4B). A l'inverse, l'émission de la fluorescence excitée à deux photons se produit à des longueurs d'onde inférieures. Par contre, il est important de souligner que les fluorophores sont identiques à ceux connus en fluorescence conventionnelle et présentent donc des propriétés spectrales d'émission identiques. Il est donc possible de se reposer sur les connaissances des propriétés de fluorescence pour optimiser les longueurs d'onde d'excitation et les zones spectrales de détection.

La génération de second harmonique (*second harmonic generation*, SHG) est un mode de contraste optique non linéaire complémentaire du précédent [11]. C'est un processus où un faisceau incident de fréquence ω donne naissance à un faisceau harmonique de fréquence 2ω sans absorption. Ce phénomène est lié à la présence d'électrons polarisables au niveau moléculaire et ne se produit que dans le cas d'une organisation non centrosymétrique à cette échelle. Toutefois, l'échelle du volume focal où se fait l'excitation du matériau englobe un grand nombre de molécules. Or, les émissions de SHG sont cohérentes et les ondes émises à 2ω peuvent alors interférer entre elles. Il est donc indispensable d'avoir également une organisation non centrosymétrique à l'échelle macro-moléculaire pour assurer des interférences constructives et donc une construction efficace du signal SHG à l'échelle du volume focal. Dans le cas contraire, les signaux disparaissent par interférences destructives et aucun signal ne peut être détecté. La SHG peut donc être détectée uniquement dans le cas d'une organisation non centrosymétrique à l'échelle moléculaire, échelle où sont générés les signaux élémentaires, et d'une organisation non centrosymétrique à l'échelle du volume focal afin de garantir la construction de signaux suffisamment importants pour être détectés. Les signaux SHG sont ainsi très spécifiques des structures non centrosymétriques hiérarchiques.

Dans ce chapitre, seules les interactions à deux photons sont présentées, même si d'autres types d'interaction existent en microscopie optique non linéaire. On peut par exemple citer la fluorescence excitée à trois photons (*three-photon excited fluorescence*, 3PEF) qui permet d'imager les différents fluorophores (les structures observées dans ces interactions sont identiques à celles qui émettent une fluorescence conventionnelle), la génération de troisième harmonique (*third harmonic generation*, THG) qui est sensible aux interfaces et aux hétérogénéités optiques ou les diffusions Raman cohérentes (*coherent antistokes Raman scattering*, CARS, ou *Stimulated Raman Scattering*, SRS) qui permettent de solliciter des modes vibrationnels spécifiques au sein des molécules. Enfin, il est important de souligner les travaux de l'équipe de W. Warren en microscopie pompe-sonde pour l'étude des peintures de chevalet. Cette technique se différencie de la précédente, car son principe est de tirer parti du délai entre deux faisceaux laser (faisceau pompe et faisceau sonde). Il est ainsi possible de discriminer certains pigments organiques et inorganiques [12,13].

Ces phénomènes non linéaires sont très peu probables et ne peuvent donc pas être générés avec un éclairage conventionnel. Il est donc nécessaire de concentrer temporellement et spatialement la lumière du faisceau excitateur afin d'optimiser la probabilité de susciter ces interactions. La microscopie optique non linéaire requiert donc l'utilisation d'un laser pulsé, de type laser titane-saphir, qui permet d'obtenir des impulsions laser d'une durée de l'ordre de la centaine de femtosecondes (concentration temporelle de la lumière). Par ailleurs, il est indispensable d'utiliser des objectifs de microscope à forte ouverture numérique afin de diminuer la taille du volume focal (concentration spatiale de la lumière). Il est important de noter que les objectifs utilisés en imagerie biomédicale sont le plus souvent à immersion à eau afin d'éviter la réflexion de la lumière à la surface de l'échantillon et d'optimiser ainsi la profondeur de pénétration. Le transfert de ces techniques d'imagerie pour l'investigation des objets du patrimoine impose donc un changement d'objectif pour garantir des analyses sans contact. Un élément critique de ce type de microscopie est la faible intensité lumineuse émise (au mieux de l'ordre de quelques centaines de photon). Il est donc nécessaire d'utiliser des détecteurs très sensibles, généralement des photo-multiplicateurs. La détection doit donc être isolée de toute lumière extérieure parasite. Enfin, il est important de noter que l'émission de lumière se fait dans le domaine visible, domaine spectral où les matériaux peuvent être diffusants ou absorbants. La profondeur de pénétration de cette technique est donc limitée par les propriétés optiques des matériaux sondés.

Un schéma d'un microscope optique non linéaire est présenté sur la Figure 4A. Outre les éléments clés cités précédemment, on peut noter la présence de détecteurs vers l'avant (configuration optique en transmission) et vers l'arrière (en réflexion). Sur chacune de ces voies de détection, il est possible de séparer spectralement, à l'aide de miroirs dichroïques, la fluorescence de la SHG émises par l'échantillon afin de détecter simultanément les deux types de signaux.

Si les applications dans le domaine biomédical sont nombreuses, la microscopie optique non linéaire est encore une technique émergente dans le domaine de la caractérisation des objets du patrimoine. La première application de la microscopie optique non linéaire a été la détection de fluorescence provenant d'écritures peintes à la surface

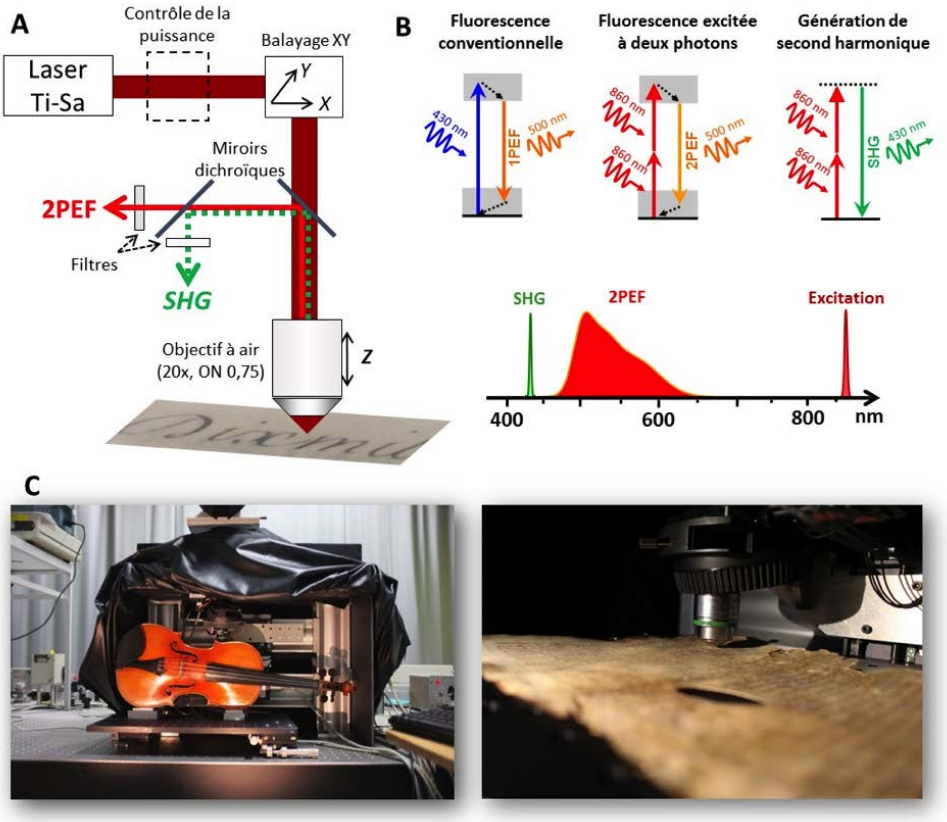


FIGURE 4 – Le principe de la microscopie optique non linéaire ou microscopie multiphoton. (A) Schéma d'un microscope optique non linéaire (dispositif expérimental du Laboratoire d'optique et biosciences – LOB, École polytechnique). (B) Diagrammes de Jablonski illustrant les processus de fluorescence et de génération de second harmonique ainsi que les longueurs d'onde d'émission de ces deux processus non linéaires. (C) Photo du microscope du LOB lors de l'analyse d'un violon et de parchemins médiévaux. Adaptée de [14].

d'un échantillon archéologique, une amphore romaine du II^{e} siècle av. J.-C. [9]. Des études réalisées sur des échantillons modèles ont permis d'illustrer la complémentarité des modes de contraste [10,15]. Plus récemment, plusieurs études ont montré le potentiel de cette technique sur différents objets : peintures, instruments de musique, cuirs, parchemins, os (voir partie 3 sur les applications). Cette liste n'est pas exhaustive et les recherches actuelles continuent d'explorer les applications possibles de cette technique prometteuse.

3 La caractérisation des objets du patrimoine

3.1 Couches picturales et vernis

Les propriétés optiques des peintures peuvent être très variables d'un objet à l'autre. En effet, le propre même de l'œuvre picturale est de jouer sur les effets visuels

(brillance, couleur, opacité...). Cela signifie que les propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière dans le domaine du visible sont très différentes d'un matériau à l'autre. Par ailleurs, les couches picturales sont des matériaux généralement très diffusants afin de garantir l'effet coloré par diffusion multiple de la lumière et par une couverture totale ou partielle des couches sous-jacentes. Or, les systèmes d'imagerie présentés ici, OCT ou microscopie optique non linéaire, sont sensibles sur les domaines du visible ou du proche infrarouge. Il est donc généralement difficile pour les techniques d'imagerie optique conventionnelles d'arriver à traverser l'ensemble des couches picturales superposées pour proposer une stratigraphie virtuelle complète d'une peinture, équivalente à un prélèvement enrobé puis coupé selon la direction transverse pour observer sa stratigraphie en microscopie conventionnelle.

L'OCT permet plus particulièrement de repérer les interfaces et donc de mesurer précisément les épaisseurs de couches transparentes ou semi-transparentes tels que les couches picturales peu concentrées en charges ou les vernis (Figure 5A-C) [8,16-19]. En utilisant une source dans l'infrarouge, les couches picturales peuvent être plus facilement traversées et il est possible de pénétrer plus profondément dans l'échantillon [20]. Il est également possible avec les systèmes les plus résolus spatialement de discriminer les pigments en fonction de leur taille, de leur forme et de leur granulométrie.

L'intérêt de la microscopie optique non linéaire vient de la spécificité des signaux émis. Les signaux de fluorescence dépendent de la nature du liant et des pigments [14,19]. Il est dans ce cas possible de discriminer les matériaux en jouant sur les propriétés d'excitation et/ou d'émission de fluorescence. Même s'il s'agit ici de fluorescence excitée à deux photons, il est possible de se reposer sur la connaissance des propriétés spectrales de fluorescence conventionnelle. Il a par exemple été montré qu'il est possible de séparer la laque de cochenille de la sandarac en jouant sur la longueur d'onde du faisceau excitateur (Figure 5D) [14]. Mais, il est également possible de détecter des signaux spécifiques de SHG pour des pigments qui présentent des structures cristallines non centrosymétriques (Figure 5D). Ainsi, il est possible d'obtenir une imagerie spécifique du sulfate de calcium hémi-hydrate (bassanite) émetteur de SHG, alors que les deux autres formes de plâtre (anhydre et di-hydraté, gypse) n'émettent pas de SHG [14].

3.2 Instruments de musique

Dans les instruments en bois, du point de vue des matériaux, il est important de discriminer le support, le bois en tant que tel, des couches superficielles qui sont généralement des vernis qui peuvent être colorés avec des colorants ou des pigments. Les vernis des instruments en bois servent souvent à magnifier l'apparence du bois sous-jacent, tel l'érable ondé utilisé pour la manufacture des instruments à cordes frottées. Ils ont donc la propriété optique d'être brillants, suffisamment transparents pour observer les dessins du bois et généralement colorés. Les couches sont peu chargées en pigments ou en colorant, laissant ainsi une place de choix aux techniques d'imagerie optique. Les matériaux utilisés pour les vernis sont similaires à ceux présents dans les peintures de chevalet que ce soit au niveau des charges ou des liants. La partie précédente décrit ainsi l'intérêt de l'OCT pour accéder à une information morphologique sur le vernis et de la microscopie optique non linéaire pour obtenir une information plus spécifique sur les matériaux qui composent ce vernis (Figure 5C-D).

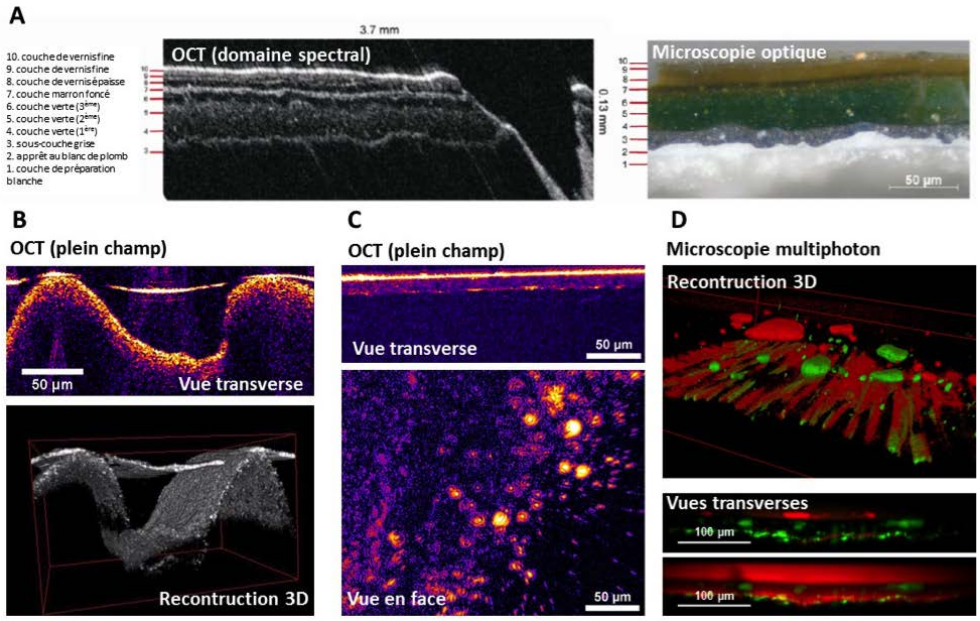


FIGURE 5 – Stratigraphies virtuelles de couches picturales et de vernis par OCT et microscopie optique non linéaire. (A) Comparaison entre la coupe virtuelle transverse obtenue en OCT et un prélèvement effectué à proximité et observée en microscopie optique conventionnelle. Adaptée de [17]. (B) Imagerie d'une couche de vernis déposée à la surface d'une couche picturale et (C) d'un vernis chargé à la surface d'un violon du XVIII^{e} siècle par OCT plein champ. Adaptée de [16]. (D) Microscopie optique non linéaire (fluorescence en rouge et SHG en vert) de couches de vernis chargé déposées sur du bois. Les vues transverses illustrent l'intérêt d'utiliser les propriétés spectrales de fluorescence pour discriminer la sandarac (en bas) de la laque de cochenille (au milieu). Adaptée de [14].

Du fait des propriétés de transparence du vernis, il est également possible d'observer la structure du bois : les cellules végétales ont des tailles de plusieurs dizaines de micromètres qui sont donc facilement observables avec les techniques de microscopie. La microscopie optique 3D offre la possibilité de reconstruire, à partir du volume de données enregistrées, par OCT ou par microscopie optique non linéaire, les différents plans de coupes traditionnels utilisés en xylologie. Il est ainsi possible de caractériser la structure du bois dans sa profondeur [14,16]. De plus, les parois des cellules végétales sont composées de lignine, matériau fluorescent, et de cellulose, molécule non centrosymétrique. La microscopie optique non linéaire permet donc de dissocier ces deux composants au sein des parois cellulaires et de quantifier ainsi la présence de cellulose cristalline responsable en particulier des propriétés mécaniques du bois [14].

3.3 Cuirs et parchemins

La peau, sous la forme de cuir ou de parchemin, est très présente dans les collections patrimoniales, en premier lieu dans les archives et les bibliothèques, comme matériau de couverture ou en tant que support d'écriture d'ouvrages et de manuscrits médiévaux. On la trouve également dans les musées, témoignant ainsi des usages à des fins

vestimentaires, décoratives ou rituelles, tels que costumes, instruments de musiques, tentures murales, sans oublier les spécimens naturalisés et les momies dont la peau est une composante essentielle. Dans le cas des cuirs et des parchemins, les poils, l'épiderme et l'hypoderme sont éliminés afin de ne préserver que la couche du derme dont le constituant majoritaire est le collagène (collagène fibrillaire de type I). Différents traitements sont ensuite appliqués, tels que le séchage sous tension dans le cas des parchemins ou le tannage pour les cuirs, qui vont modifier la morphologie, les propriétés du matériau ou sa sensibilité vis-à-vis de l'environnement et de l'altération.

L'OCT a été appliquée au cas des manuscrits pour examiner l'impact de l'interaction d'encres et de pigments sur le parchemin [21,22]. L'utilisation d'une technique OCT intégrant les propriétés de polarisation de la lumière a permis de mettre en évidence des propriétés de biréfringence dans les parchemins neufs qui sont perdus lors de la dégradation. Cette approche a ainsi fait ressortir sur un manuscrit ancien la présence d'une dégradation du parchemin sous l'écriture avec une encre ferrogallique [22]. Toutefois, les signaux OCT présentent l'inconvénient de ne pas être spécifiques, ce sont donc les interfaces entre les fibres de collagène et l'air qui donnent du signal. De plus, à l'issue de leur préparation, ces matériaux sont denses. Il en résulte qu'en profondeur, les signaux deviennent rapidement homogènes au sein du parchemin.

Le collagène est la protéine majoritaire de la matrice extracellulaire chez les mammifères et il assure notamment les propriétés mécaniques de nombreux tissus et organes. Le collagène peut être organisé sous deux formes en fonction de son type : réseau ou fibrilles. Dans le second cas, le collagène présente une organisation multi-échelle hiérarchique de la molécule à l'assemblage de fibrilles, voire de fibres dans le cas du parchemin. À l'échelle moléculaire, la délocalisation électronique au niveau des liaisons peptidiques assure une génération efficace des signaux de SHG. Puis, à l'échelle du volume focal, qui englobe un grand nombre de molécules [23], l'émission efficace des signaux de SHG par interférences constructives ne peut se faire que dans le cas d'une organisation fibrillaire qui est non centrosymétrique. Ainsi, seul le collagène sous sa forme fibrillaire peut donner lieu à des signaux de SHG. L'absence de ces signaux traduit une rupture dans l'organisation hiérarchique du collagène fibrillaire, quelle que soit l'échelle à laquelle est modifiée cette organisation. Il n'est alors pas possible de déterminer à quelle échelle se produit cette rupture.

Sur des peaux ou des cuirs, l'acquisition des images est effectuée uniquement vers l'arrière (configuration en réflexion) tandis que sur les parchemins, dont l'épaisseur est autour de 200 µm, la lumière peut traverser tout le matériau permettant également une collecte des signaux vers l'avant (configuration en transmission). Cependant, la profondeur de pénétration va dépendre de la compacité des fibres de collagène. Ainsi, avec une excitation laser à 860 nm, un objectif à air 20× (ouverture numérique 0,75) et une puissance sous l'objectif inférieure à 20 mW, cette profondeur est d'environ 140 µm sur la face chair (face interne de la peau) contre 100 µm sur la face fleur (face externe) sur une peau ou un cuir, et de 70-80 µm sur un parchemin.

La microscopie optique non linéaire permet ainsi de visualiser l'influence des techniques de préparation de la peau sur la morphologie des fibres de collagène et de corréler ces observations avec les propriétés du matériau. Ainsi, les images SHG des

parchemins permettent d'observer la réorganisation tridimensionnelle des fibres de collagènes parallèlement à la surface liée à l'étape de séchage de la peau sous tension lors de la préparation du parchemin (Figure 6A) [24]. Dans le cas des cuirs, la morphologie des fibres de collagène ainsi que les signaux SHG et 2PEF enregistrés diffèrent selon le tannin utilisé pour fixer la peau. Dans le cas des cuirs souples, tels que les peaux préparées à l'alun ou tannées au chrome, les images SHG montrent une structure aérée avec des fibres fines, tandis que pour les cuirs de tannage végétal, connus pour être épais et rigides, les fibres visualisées sont plus grosses et plus compactes (Figure 6B-D) [25]. Concernant les signaux enregistrés, les cuirs de tannage au chrome présentent un signal SHG important avec une fluorescence seulement localisée dans des zones isolées du matériau. Dans le cas des cuirs de tannage végétal ou les peaux préparées à l'alun, le signal SHG est plus faible et un signal de fluorescence important est enregistré sur l'ensemble du matériau. Cette fluorescence est certainement associée à la nature des matériaux introduits dans ces peaux pour leur fixation, soit les composés polyphénols pour les tannins végétaux et les corps gras comme lubrifiant. On notera que, du fait de la forte absorption du signal à deux photons par les cuirs de tannage végétal, la puissance du laser à la surface de l'échantillon est réduit à quelques milliwatts pour l'imagerie afin d'éviter tout dommage.

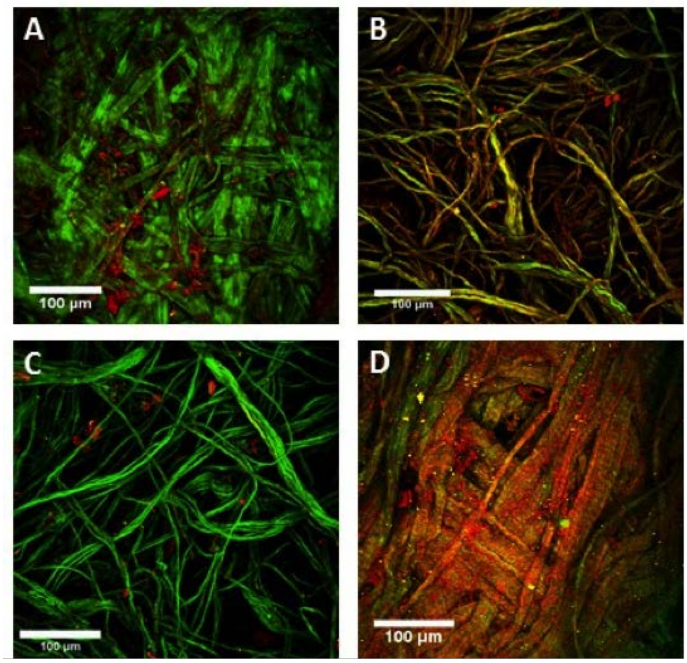


Figure 6 – Imagerie par microscopie optique non linéaire de parchemins et de cuirs. Les images sont présentées en fausses couleurs : fluorescence en rouge et SHG en vert : (A) parchemins, et cuirs tannés (B) à l'alun, (C) au chrome et (D) au végétal. Adaptée de [24,25].

Selon leur mode de fabrication, les matériaux à base de peau auront un comportement différent vis-à-vis des agents de détérioration. Les deux mécanismes principaux d'al-

tération de ces matériaux sont l'hydrolyse et l'oxydation, qui induisent une rupture de liaisons au sein de la molécule de collagène. Le stade ultime de l'altération est la dénaturation ou « gélatinisation », lorsque la triple hélice de collagène se dissocie pour former de la gélatine, suite à un contact avec l'eau. Etant donné que la gélatinisation est un processus irréversible, un des défis principaux pour la conservation de ce patrimoine est de pouvoir identifier le collagène dans un état de « pré-gélatinisation » de sorte que des traitements ou des conditions de conservation adaptées au matériau soient définis.

L'approche classique pour déterminer l'état de conservation des matériaux à base de peau est basée sur des analyses thermiques, telle que la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), qui sont des techniques invasives et destructives ne fournissant qu'une information moyennée et relative à la zone échantillonnée. La microscopie optique non linéaire, par son approche non invasive, offre une alternative intéressante pour évaluer cet état de conservation sur les matériaux à base de peau. En effet, dans le cas d'un parchemin ou d'un cuir altéré, les intensités des signaux SHG et de fluorescence sont modifiées, ainsi que l'organisation tridimensionnelle des fibres de collagène [24,25]. Un fort signal de SHG, caractéristique du collagène intact, est obtenu sur les zones préservées des parchemins et des cuirs, tandis que ce signal diminue et peut même disparaître au profit de la fluorescence dans les zones altérées (Figure 7). Cette modification des signaux est souvent accompagnée, au niveau morphologique, d'une perte de la structure fibrée au profit d'un matériau compact et amorphe, principalement dans les échantillons gélatinisés. Une approche corrélative combinant la microscopie optique non linéaire et la nanoscopie infrarouge (nanoIR, spectrocopie infrarouge réalisée sous un microscope à force atomique (AFM) afin de bénéficier d'une résolution spatiale de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres) a été développée afin d'interpréter la nature chimique des modifications enregistrées en microscopie optique non linéaire lors de la gélatinisation [24]. Cette approche a permis de confirmer sur les parchemins que la perte de signal SHG et l'augmentation du signal de fluorescence lors de la dégradation sont bien associées à la formation de gélatine.

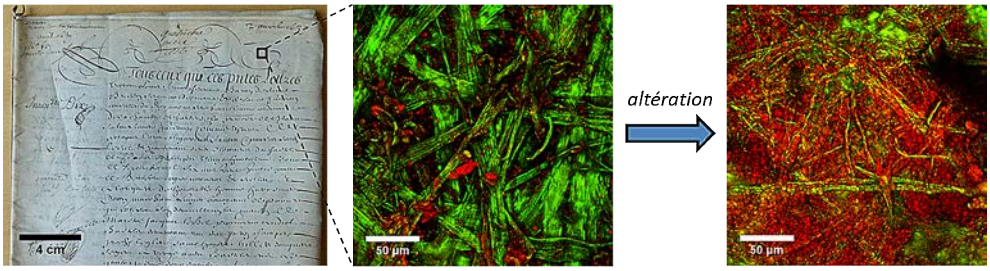


Figure 7 – Imagerie de microscopie optique non linéaire de parchemins. Un parchemin dans un bon état de conservation est majoritairement composé de collagène fibrillaire qui émet de forts signaux de SHG (en vert). La dégradation du parchemin est liée à une dénaturation du collagène où les signaux de SHG s'atténuent au profit de la fluorescence (en rouge). Adaptée de [24].

3.4 Verres et glaçures

Les verres et les glaçures sont des matériaux transparents dont la microstructure peut être source d'informations sur la technologie ou l'altération de l'objet. La microscopie électronique à balayage a été l'une des principales techniques utilisées pour examiner cette microstructure, en revanche celle-ci nécessite le prélèvement d'un échantillon, ce qui peut être délicat à obtenir, voire impossible en fonction l'objet. Aussi, l'OCT est apparue comme une technique alternative pour l'étude de ce type de collection car elle permet d'accéder, de façon non invasive et rapide, à une coupe virtuelle de la surface du verre. Ainsi, cette technique a notamment permis d'accéder à des informations sur les techniques de fabrication céramiques glaçurées et de jade, en caractérisant la morphologie des craquelures [26], et de distinguer différentes catégories pour des faïences égyptiennes à partir des morphologies de la couche de glaçure et son interaction avec la pâte [27]. La profondeur de pénétration reste cependant limitée, en conséquence l'information est restreinte aux premières couches de surface du verre.

L'OCT s'est également montrée utile pour examiner de façon non invasive l'état de conservation des verres. L'altération d'un verre est généralement associée dans un premier temps à la formation d'une couche hydratée en surface, suite à la lixiviation des alcalins, qui peut être suivie ou accompagnée d'une dissolution du réseau silicaté lorsque des pH $>$ 9 sont atteints. Cette couche hydratée en surface est très sensible aux variations climatiques, et un climat sec peut induire un réseau de craquelure (« *crizzling* ») pouvant entrainer, selon l'épaisseur de la couche, une délamination de surface jusqu'à une perte complète de l'objet. Afin d'évaluer l'état d'altération d'un verre, il est important de pouvoir détecter cette couche hydratée sur les verres et évaluer son épaisseur. Des mesures par OCT réalisées sur des vitraux et des verres issus des collections muséales ont permis de montrer que la technique permet d'identifier la couche altérée et d'évaluer son épaisseur [28]. De plus, l'OCT fourni des informations sur les irrégularités en surface du verre, telles que des fissures, trous, cratères ou dépôts de surface. L'observation de ces détails et la mesure des épaisseurs sont cependant limitées par la résolution axiale de l'instrument.

4 Perspectives d'évolutions et verrous technologiques

L'OCT est désormais une technique bien établie dans le domaine biomédical. Les avancées technologiques associées à des traitements de données de plus en plus performants permettent d'accéder aujourd'hui à des systèmes commerciaux à des prix abordables (à partir de quelques dizaines de k€). La technologie est mûre et robuste. Elle permet notamment d'accéder à des systèmes compacts et qui peuvent être transportables. Les principaux choix en terme de technologie reposent sur les résolutions spatiales attendues et le temps d'acquisition disponible. L'OCT fréquentiel permet une imagerie en temps réel avec une résolution latérale autour de 5 à 15 µm. La seconde technologie, l'OCT plein champ (également appelée *optical coherence microscopy* OCM), donne accès à une imagerie 3D avec une résolution spatiale homogène dans les trois directions de l'ordre du micromètre. Toutefois, dans ce cas, l'inconvénient principal est le temps d'acquisition qui peut atteindre plusieurs minutes pour un volume 3D. Il est important de noter que les travaux de recherche actuels visent

à dépasser ces limites. Par ailleurs, il est évident que les contraintes en termes de vitesse d'acquisition sur des objets patrimoniaux sont plus faibles que dans le cas de l'imagerie *in vivo* dans le domaine biomédical. Par ailleurs, les dispositifs d'imagerie OCT sont de plus en plus compacts et suffisamment robustes vis-à-vis des vibrations. Il est donc tout à fait envisageable d'avoir un système transportable pour faire des analyses *in situ* sur les collections patrimoniales.

En parallèle, la microscopie optique non linéaire a également bénéficié de nombreuses avancées technologiques. Toutefois, les systèmes d'imagerie restent coûteux (entre 150 et 400 k€), notamment du fait de la nécessité de disposer d'un laser pulsé comme source d'illumination. Le principal avantage de cette technique est la possibilité d'accéder à une imagerie 3D spécifique des matériaux. La résolution spatiale est de l'ordre du micromètre. Tant du fait de l'encombrement des lasers que de la stabilité nécessaire pour les optiques, les systèmes de microscopie optique non linéaire sont encore éloignés de versions portables. Il est donc plus réaliste d'envisager des systèmes sur des plateaux d'imagerie ou éventuellement des systèmes transportables qui pourraient se déplacer d'une salle à l'autre au sein d'un musée.

Aujourd'hui, l'endoscopie est un enjeu majeur pour l'imagerie biomédicale. En effet, du fait des faibles profondeurs de pénétration dans les tissus biologiques des techniques optiques, il est indispensable de recourir à des systèmes fibrés pour accéder aux tissus au sein du corps humain. Cette configuration a un réel intérêt pour l'étude des objets du patrimoine car elle permet d'éloigner l'objet à analyser du microscope, et ainsi de s'affranchir de la contrainte de l'observation sous un microscope (objet horizontal et avec un faible encombrement), et d'accéder à des zones plus difficile d'accès dans le cas d'objets en volume ou creux. De nombreux développements ont été réalisés pour l'OCT [1]. Toutefois, dans le cas de la microscopie optique non linéaire, l'utilisation de ces fibres pose de réelles difficultés. En effet, pour solliciter les effets non linéaires attendus, il est indispensable d'exciter les échantillons avec un laser pulsé. Or, les fibres ont la propriété de disperser la lumière et il est donc difficile de préserver cette caractéristique de la source d'illumination après une propagation le long de quelques mètres de fibres optiques. Des solutions technologiques ont été proposées et ont permis la réalisation de premiers prototypes d'endoscopes non linéaires [29]. Une autre alternative dans le cas de la microscopie optique non linéaire est l'utilisation d'un bras articulé composé de miroirs pour envoyer le faisceau laser excitateur sur la zone à analyser. Un système de microscopie relativement compact et constitué de bras articulés (afin d'accéder à différentes zones du derme sur le corps humain) a été développé par la société Jenlab (systèmes DermaInspect et MPT flex). Les verrous technologiques permettant de miniaturiser et surtout de baisser le coût des lasers pulsés sont progressivement levés. Il est donc tout à fait possible d'envisager à terme des systèmes de microscopie multiphoton compacts, plus accessibles en termes de prix et éventuellement fibrés.

Ces dernières années, la microscopie optique non linéaire a montré un grand potentiel pour évaluer l'état de dégradation du collagène dans les cuirs et les parchemins. Toutefois, il est nécessaire d'aller au-delà de l'imagerie qualitative du collagène et d'accéder à une information quantitative plus objective pour fournir un outil de diagnostic pour

les conservateurs, restaurateurs et scientifiques du patrimoine. Les recherches actuelles s'orientent donc vers le développement de mesures quantitatives de l'état de dégradation du parchemin. Cette approche, inspirée des travaux déjà menés dans le domaine biomédical [30,31] est basée sur la mesure des signaux de SHG résolus en polarisation. L'objectif à terme sera de pouvoir sonder, toujours de façon non invasive, les premiers stades de dégradation des parchemins avant que l'évolution des intensités des signaux ne soit observable. Cette approche présente l'avantage d'être quantitative et d'accéder ainsi à une mesure objective de l'état de conservation du collagène. Ainsi il sera possible de formuler des recommandations en matière de conservation et de restauration et cela sans faire de prélèvement sur l'objet.

Les signaux de SHG sont spécifiques du collagène fibrillaire. Nous avons montré l'intérêt de cette technique d'imagerie pour les cuirs et les parchemins, mais il est également possible de l'utiliser pour l'analyse de l'état de conservation de peaux d'espèces naturalisées [25]. En effet, les problématiques d'évaluation de l'état de conservation du collagène sont identiques. Plus généralement, cette protéine se retrouve dans la matrice extracellulaire des tissus des mammifères. Ainsi, au-delà de la peau, cette technique de microscopie peut permettre d'effectuer de l'imagerie de nombreux organes, et en particulier les os, très présents dans les collections du patrimoine [32,33]. Plus généralement, les signaux de SHG sont spécifiques et liés à l'organisation non centrosymétriques à différentes échelles. Ainsi, les applications potentielles de la microscopie SHG sont encore largement à explorer parmi les matériaux présents dans les collections patrimoniales.

Parallèlement aux signaux de SHG spécifiques des structures non centrosymétriques, il est possible de détecter simultanément la fluorescence excitée à deux photons. Cette fluorescence diffère de la fluorescence conventionnelle seulement par le processus d'excitation à deux photons, ses caractéristiques d'émission sont identiques. Il est donc possible de se reporter aux propriétés de fluorescence des matériaux présents parmi les objets du patrimoine et de jouer tant sur les propriétés d'excitation (les lasers pulsés utilisés sont accordables entre 700 et 1 300 nm) que sur les propriétés d'émission afin de discriminer les matériaux et/ou d'avoir des pistes d'identification. Enfin, il est possible de réaliser de la spectroscopie des signaux de fluorescence émis afin d'accéder à une signature plus précise de ces matériaux et d'envisager une éventuelle discrimination.

Les techniques de microscopie optique ont un rôle clé à jouer dans l'analyse et la caractérisation des objets du patrimoine. Elles permettent une analyse sans contact et non destructive des matériaux, indispensable pour des objets anciens et parfois historiques. Les résolutions atteintes donnent accès à une caractérisation fine de l'organisation stratigraphique des différentes couches et des charges présentes. Toutefois, comme toute autre technique, elles doivent être envisagées en complément d'autres techniques d'analyse. Seule cette complémentarité garantit l'accès à une connaissance qui se veut la plus exhaustive possible des matériaux : nature, recettes de préparation, stratigraphie, état de conservation.

Remerciements

Les auteurs remercient les collègues et collaborateurs impliqués dans ces travaux de recherche. En particulier, Jean-Philippe Echard, Mady Elias, Jean-Marc Frigerio, Marie-Claire Schanne-Klein, Margaux Schmeltz et Sylvie Thao. Ils remercient également Marie-Claire Schanne-Klein pour sa relecture attentive et les corrections apportées à ce texte.

Références

[1] W. Drexler and J. Fujimoto, eds., *Optical coherence tomography, technology and applications* (Springer, 2015).

[2] A. Dubois, ed., *Handbook of full-field optical coherence microscopy* (Pan Standford Publishing, 2016).

[3] W. Denk, J. Strickler, and W. Webb, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, Science 248, 73–76 (1990).

[4] D. Huang, E. Swanson, C. Lin, J. Schuman, W. Stinson, W. Chang, M. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. Puliafito, and J. G. Fujimoto, Optical coherence tomography, Science 254, 1178–1181 (1991).

[5] M.-L. Yang, C.-W. Lu, I.-J. Hsu, and C. C. Yang, The use of optical coherence tomography for monitoring the subsurface morphologies of archaic jades, Archaeometry 46, 171–182 (2004).

[6] P. Targowski, B. Rouba, M. Wojtkowski, and A. Kowalczyk, The application of optical coherence tomography to nondestructive examination of museum objects, Stud. Conserv. 49, 107–114 (2004).

[7] H. Liang, M. Cid, R. Cucu, G. Dobre, A. Podoleanu, J. Pedro, and D. Saunders, En-face optical coherence tomography – a novel application of non-invasive imaging to art conservation, Opt. Express 13, 6133–6144 (2005).

[8] P. Targowski, M. Gora, and M. Wojtkowski, Optical coherence tomography for artwork diagnostics, Laser Chemistry 2006, Article ID 35373 (2006).

[9] I. G. Cormack, P. Loza-Alvarez, L. Sarrado, S. Tomas, I. Amat-Roldan, L. Torner, D. Artigas, J. Guitart, J. Pera, and J. Ros, Lost writing uncovered by laser two-photon fluorescence provides a terminus post quem for Roman colonization of Hispania Citerior, J. Archaeol. Science 34, 1594 – 1600 (2007).

[10] G. Filippidis, E. J. Gualda, K. Melessanaki, and C. Fotakis, Nonlinear imaging microscopy techniques as diagnostic tools for art conservation studies, Opt. Lett. 33, 240–242 (2008).

[11] F. Pavone and P. Campagnola, eds., *Second harmonic generation imaging* (CRC Press, 2014).

[12] P. Samineni, A. deCruz, T. E. Villafana, W. S. Warren, and M. C. Fischer, Pump-probe imaging of historical pigments used in paintings, Opt. Lett. 37, 1310–1312 (2012).

[13] T. E. Villafana, W. P. Brown, J. K. Delaney, M. Palmer, W. S. Warren, and M. C. Fischer, Femtosecond pump-probe microscopy generates virtual cross-sections in historic artwork, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 1708–1713 (2014).

[14] G. Latour, J.-P. Echard, M. Didier, and M.-C. Schanne-Klein, *In situ* 3D characterization of historical coatings and wood using multimodal nonlinear optical microscopy, Opt. Express 20, 24623–24635 (2012).

[15] G. Filippidis, K. Melessanaki, and C. Fotakis, Second and third harmonic generation measurements of glues used for lining textile supports of painted artworks, Anal. Bioanal. Chem. 395, 2161–2166 (2009). 10.1007/s00216-009-3060-x.

[16] G. Latour, J.-P. Echard, B. Soulier, I. Emond, S. Vaiedelich, and M. Elias, Structural and optical properties of wood and wood finishes studied using optical coherence tomography : application to an 18th century Italian violin, Appl. Opt. 48, 6485–6491 (2009).

[17] C. S. Cheung, M. Spring, and H. Liang, Ultra-high resolution fourier domain optical coherence tomography for old master paintings, Opt. Express 23, 10145–10157 (2015).

[18] P. Targowski, M. Iwanicka, B. Rouba, and C. Frosinini, Oct for examination of artwork, in Optical Coherence Tomography, , W. Drexler and J. G. Fujimoto, eds. (Springer International Publishing, 2015), pp. 2473–2495.

[19] H. Liang, M. Mari, C. S. Cheung, S. Kogou, P. Johnson, and G. Filippidis, Optical coherence tomography and non-linear microscopy for paintings - a study of the complementary capabilities and laser degradation effects, Opt. Express 25, 19640–19653 (2017).

[20] C. S. Cheung, J. M. O. Daniel, M. Tokurakawa, W. A. Clarkson, and H. Liang, Optical coherence tomography in the 2-Âµm wavelength regime for paint and other high opacity materials, Opt. Lett. 39, 6509–6512 (2014).

[21] P. Targowski, M. Pronobis-Gajdzis, A. Surmak, M. Iwanicka, E. A. Kaszewska, and M. Sylwestrzak, The application of macro-X-ray fluorescence and optical coherence tomography for examination of parchment manuscripts, Stud. Conserv. 60, S167–S177 (2015).

[22] M. Gora, M. Pircher, E. Gotzinger, T. Bajraszewski, M. Strlic, J. Kolar, C. Hitzenberger, and P. Targowski, Optical coherence tomography for examination of parchment degradation, Laser Chemistry p. 68679 (2006).

[23] S. Bancelin, C.Aimé, I. Gusachenko, L. Kowalczuk, G. Latour, T. Coradin, and M.-C. Schanne-Klein, Determination of collaen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals, Nature Communications 5, 4920 (2014).

[24] G. Latour, L. Robinet, A. Dazzi, F. Portier, A. Deniset-Besseau, and M.-C. Schanne-Klein, Correlative nonlinear optical microscopy and infrared nanoscopy reveals collagen degradation in altered parchments, Sci. Rep. 6, 26344 (2016).

[25] L. Robinet, S. Thao, M.-C. Schanne-Klein, and G. Latour, The influence of manufacturing and alterations on skin-based artifacts as characterized by nonlinear optical microscopy, in ICOM-CC 18th Triennal Conference Preprints, , J. Bridgland, ed. (Paris : Internation Council of Museums, 2017).

[26] M.-L. Yang, A. Winkler, J. Klein, A. Wall, and J. Barton, *Chapter 13. Using Optical Coherence Tomography to Characterize the Crack Morphology of Ceramic Glaze and Jade* (InTech, 2012).

[27] H. Liang, M. Sax, D. Saunders, and M. Tite, Optical coherence tomography for the non-invasive investigation of the microstructure of ancient egyptian faience, J. Archaeol. Sci. 39, 3683 – 3690 (2012).

[28] J. Kunicki-Goldfinger, P. Targowski, M. Gora, P. Karaszkiewicz, and P. Dzierzanowski, Characterization of glass surface morphology by optical coherence tomography, Stud. Conserv. 54, 117–128 (2009).

[29] G. Ducourthial, P. Leclerc, T. Mansuryan, M. Fabert, J. Brevier, R. Habert, F. Braud, R. Batrin, C. Vever-Bizet, G. Bourg-Heckly, L. Thiberville, A. Druilhe, A. Kudlinski, and F. Louradour, Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal, Sci. Rep. 5, 18303 (2015).

[30] I. Gusachenko, G. Latour, and M.-C. Schanne-Klein, Polarization-resolved second harmonic microscopy in anisotropic thick tissues, Opt. Express 18, 19339–19352 (2010).

[31] G. Latour, I. Gusachenko, L. Kowalczuk, I. Lamarre, and M.-C. Schanne-Klein, *In vivo* structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy, Biomed. Opt. Express 3, 1–15 (2012).

[32] B. Thomas, D. McIntosh, T. Fildes, L. Smith, F. Hargrave, M. Islam, T. Thompson, R. Layfield, D. Scott, B. Shaw, C. Burrell, S. Gonzalez, and S. Taylor, Second-harmonic generation imaging of collagen in ancient bone, Bone Rep. 7, 137 – 144 (2017).

[33] R. Genthial, E. Beaurepaire, M.-C. Schanne-Klein, F. Peyrin, D. Farlay, C. Olivier, Y. Bala, G. Boivin, J.-C. Vial, D. Debarre, and A. Gourrier, Label-free imaging of bone multiscale porosity and interfaces using third-harmonic generation microscopy, Sci. Rep. (2017).