THESE DE DOCTORAT

ONIRIS

Ecole Doctorale n° 605

Ecole doctorale Biologie-Santé

Spécialité : Analyse et Traitement de l'Information et des Images médicales

Par

Ibrahim HASSANI

Exploration 3D de la fibre musculaire et de son environnement en contexte pathologique : développement de *workflow* de l'acquisition à l'analyse d'image pour une approche multi-échelle et multimodale

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 28 novembre 2025

Unité de recherche : UMR 703 PAnTher

Rapporteurs avant soutenance :

Giulia Bertolin	Chargé de Recherche, CNRS - UMR6290 - IGDR, Rennes
Alicia Mayeuf-Louchart	Chargé de Recherche, INSERM - UMR-S 1172, Lille

Composition du Jury :

Présidente :

Laétitia Guével	Professeur des Universités, INSERM UMR-S 1307 - CRCI2NA, Nantes Université, Nantes

Examinateurs :

Luigi Bonacina	Associate Professor, Department of Applied Physics, Université de Genève, Genève
Frédéric Jamme	Responsable de ligne DISCO, Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette

Dir. de thèse :

Karl Rouger	Directeur de Recherche, Oniris/INRAE UMR 703, Nantes

Co-dir. de thèse :

Marie-Anne Colle	Professeur des Universités, Oniris/INRAE UMR 703, Nantes

Co-encadrant de thèse :

Laurence Dubreil	Ingénieur de Recherche, Oniris/INRAE UMR 703, Nantes

Invité(s) :

Hubert Konik	Maître de conférence - Université Jean-Monnet/Telecom - UMR5516, Saint-Etienne
Tony Fiore	Responsable système microscopie high-end, Nikon healthcare France, Champigny-sur-Marne

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux rapporteures de cette thèse, Giulia Bertolin et Alicia Mayeuf-Louchart, pour le temps qu'elles ont consacré à l'évaluation de ce travail et pour la richesse de leurs échanges et de leurs remarques.

Je remercie également les autres membres du jury de thèse, Laëtitia Guével, Luigi Bonacina, Frédéric Jamme et Hubert Konik pour l'intérêt porté à ce travail et pour la qualité de leurs échanges lors de la soutenance.

J'adresse également mes remerciement pour Marie-Claire Schanne-Klein, Anne-Sophie Macé et Fabrice Chrétien pour leurs conseils avisés, leurs encouragements et leur accompagnement bienveillant tout au long des CSI annuels.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance envers les personnes qui ont contribué à mon encadrement de thèse. Tout d'abord, je remercie mon directeur de thèse, Karl Rouger, pour le temps qu'il m'a consacré, la confiance qu'il m'a accordée ainsi que pour ses conseils toujours avisés et ses encouragements précieux. Mes remerciements vont également à ma co-directrice de thèse, Marie-Anne Colle, pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR 703 et pour m'avoir confié ce projet à la fois ambitieux et passionnant. Je souhaite adresser mes remerciements les plus chaleureux à mon encadrante, Laurence Dubreil, pour son soutien constant, ses encouragements et les nombreux moments de partage merci sincèrement pour ta bienveillance. Enfin, un immense merci à Tony Fiore, mon responsable scientifique chez Nikon France, pour sa confiance et son accompagnement depuis mes années d'école d'ingénieur jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. Merci pour ton soutien indéfectible.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à l'ensemble de mes collègues de l'UMR 703. Un grand merci à Johan Deniaud, Mireille Ledevin et Isabelle Leroux pour votre disponibilité et votre soutien technique, sans lesquels la réalisation de ces travaux n'aurait pas été possible.

Merci Manar, pour ton énergie communicative et cette devise inoubliable « les vendredis on est bleu et métal », qui a rythmé les fins de semaine. À Oscar, pour nos discussion autour de l'optique et de la photonique… et parfois des capybaras, ainsi que pour la relecture attentive de ce manuscrit.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude à mes collègues de Nikon, pour leur accompagnement tout au long de cette aventure : merci à Laure Guérineau, responsable RH Nikon France, ainsi qu'à toute l'équipe RH pour leur disponibilité; merci à Alain Angèle, manager Nikon Healthcare France, pour sa confiance, et à l'ensemble de mes collègues pour leur soutien précieux.

Je tiens à remercier ma famille pour leur soutien inconditionnel, même à distance, pour leur compréhension face à la difficulté de revenir plus souvent à Mayotte, et pour leur présence constante tout au long de ce parcours. Un immense merci également à Dominique et Pascale pour votre gentillesse et votre soutien. À la famille Launay, et tout particulièrement à Patricia et Gaëtan, merci pour vos encouragements et les moments de partage qui ont marqué ces années.

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans citer Orlane, la personne qui occupe une place centrale dans ma vie et qui m'accompagne depuis le début de cette aventure. Merci pour ton soutien, ta patience et ta présence à chaque étape de ce parcours.

REMERCIEMENTS **1**

AVANT-PROPOS **1**

CONTEXTE SCIENTIFIQUE **4**

I. IMAGERIE MULTI-ECHELLE ET MULTIMODALE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE 5

I.1. Signaux analysés en microscopie photonique *5*

I.1.1. La fluorescence 5

I.1.1.1. Fluorescence à 1 photon (1P) 6

I.1.1.2. Fluorescence à 2 photons (2P) 7

I.1.1.3. Fluorescence à 3 photons (3P) 8

I.1.1.4. Propriétés des fluorophores 9

I.1.1.5. Fluorescence intrinsèque 10

I.1.1.6. Fluorescence extrinsèque 12

I.1.1.6.1. Protéines fluorescentes 12

I.1.1.6.2. Fluorophores synthétiques 13

I.1.2. Signaux harmoniques 14

I.1.2.1. Génération de Seconde Harmonique (SHG) 14

I.1.2.2. Génération de Troisième Harmonique (THG) 15

I.1.2.1. Les harmonophores en biologie 16

I.2. Résolution en microscopie à fluorescence *17*

I.2.1. Critère de Rayleigh 17

I.2.1. Fonction d'étalement du point (PSF) 18

I.3. Imagerie multi-échelle en microscopie à fluorescence *19*

I.3.1. Microscope confocal à balayage laser 20

I.3.2. Approches super-résolutions 21

I.3.2.1. Approche basée sur le ré-assignement de pixel : image scanning microscope (ISM) 21

I.3.2.2. Microscopie à illumination structurée 24

I.3.2.3. Imagerie par localisation de molécules uniques (SMLM) 24

I.3.2.4. Stimulated Emission Depletion (STED) 28

I.3.2.1. Intérêts des approches 29

I.3.3. Microscope à feuille de lumière 32

I.4. Imagerie multiphotonique multimodale *34*

I.4.1. Source lasers 34

I.4.2. Mode de détection : réflexion (backward) ou transmission (forward) 36

I.4.3. Polarisation 37

I.4.3.1. Polarisation linéaire 37

I.4.3.2. Polarisation circulaire 37

I.4.4. Intérêt de la microscopie multiphotonique pour l'imagerie 3D 38

I.4.5. Limite des systèmes d'imagerie classiques pour l'imagerie 3D 39

I.5. Amélioration de l'imagerie en profondeur par la transparisation des tissus *40*

I.6. Microscopie corrélative *43*

I.6.1. Repère relative 44

I.6.2. Transformation spatiale : Translation et rotation 44
I.6.3. Corrélative multimodale photonique 45
II. DE L'IMAGERIE A LA DONNEE 47
II.1. Nature des images en microscopie 47
II.1.1. Echantillonnage et quantification 48
II.2. Challenge des images issues de microscopie à fluorescence 49
II.2.1. Filtres linéaires 49
II.2.2. Filtres non-linéaires 50
II.2.3. Filtres adaptés à la morphologie 50
II.3. Segmentation par seuillage 50
II.4. Segmentation par détection de bords 52
II.5. Segmentation par région 53
II.6. Réseaux de neurones convolutifs 54
II.6.1. Introduction 54
II.6.2. Bases des Convolutional Neural Network 55
II.6.3. U-net pour la segmentation d'images biologiques 56
III. MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE EN SITUATION PHYSIOLOGIQUE 59
III.1. Vascularisation du muscle 60
III.2. Échelle cellulaire et subcellulaire du muscle squelettique 61
III.2.1. Typologie des fibres musculaires 64
III.2.2. Homéostasie musculaire 65
IV. MUSCLE EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES 67
IV.1. Dystrophie musculaire de Duchenne 67
IV.1.1. Conséquences liées à l'absence de dystrophine 68
IV.1.1.1. Complexe protéique associé à la dystrophine 68
IV.1.1.2. Manifestations cliniques 69
IV.1.1.3. Physiopathologie 69
IV.1.1.4. Remaniement tissulaire : Fibrose 70
IV.1.1.5. Désorganisation vasculaire et hypoxie chronique 71
IV.1.1.6. Désorganisation des organites 72
IV.1.2. Imagerie et caractérisation du muscle dystrophique 73
IV.2. Maladie de Pompe 74
IV.2.1. Définition 74
IV.2.2. Manifestations cliniques 75
IV.2.3. Histopathologie de la surcharge en glycogène 76
IV.2.4. Perturbations de l'autophagie 77
IV.2.5. Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif 78
IV.2.6. Imagerie et caractérisation des atteintes mitochondriales 79
RESULTATS EXPERIMENTAUX 81
V. ANALYSE 3D DU REMODELAGE VASCULAIRE ET FIBROTIQUE DU MUSCLE DYSTROPHIQUE 83
V.1. Positionnement du sujet 83

V.2. Résumé de la démarche expérimentale *84*
V.3. Résumé des résultats *84*
VI. ATTEINTES MITOCHONDRIALES ET DYSFONCTIONNEMENT LYSOSOMAL DANS LA MALADIE DE POMPE 110
VI.1. Positionnement du sujet *110*
VI.2. Objectifs scientifiques *110*
VI.3. Résumé de la démarche expérimentale *110*
VI.4. Résumé des résultats *111*
DISCUSSION **133**
CONCLUSION ET PERSPECTIVES **139**
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **140**
ANNEXES **169**

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des principes de la fluorescence 7

Figure 2: Illustration des principes de l'excitation biphotonique 8

Figure 3 : Absorption 3 photon 9

Figure 4 : Spectres d'excitation et d'émission des principaux fluorophores endogènes 11

Figure 5 : Portrait d'Osamu Shimomura 12

Figure 6 : Comparaison des signaux de fluorescence biphotonique (2PEF) et de génération de seconde harmonique (SHG) 14

Figure 7 : Génération de troisième harmonique (THG) et dépendance à la polarisation 15

Figure 8 : Signal SHG de nanoparticules 16

Figure 9 : Représentation de la fonction d'étalement du point (PSF) 19

Figure 10 : Résolutions et gammes d'observation des principaux systèmes de microscopie 20

Figure 11 : Schéma du chemin optique d'un microscope confocal 20

Figure 12 : Principe de l'Image Scanning Microscopy (ISM) spinning disk 22

Figure 13 : Schéma du chemin optique d'un microscope confocal ISM 23

Figure 14 : Principe de la microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM) 25

Figure 15 : Schéma du mécanisme de photoconversion 26

Figure 16: Principe du DNA-PAINT 27

Figure 17 : Principe fondamental du STED 28

Figure 18 : Chemin optique d'un microscope à feuille de lumière (lightsheet) 32

Figure 19 : Imagerie multimodale d'un tissu osseux 35

Figure 20: Comparaison du signal SHG en mode forward et backward sur divers tissus 36

Figure 21 : Profil d'orientation du signal SHG dans les myofibrilles 37

Figure 22: Werner Spalteholz 40

Figure 23 : Illustration d'échantillon avant et après transparisation 41

Figure 24 : Image en niveaux de gris (8 bits) d'un tissu musculaire 48

Figure 25 : Application des méthodes de seuillage d'Otsu et de Niblack 51

Figure 26 : Exemples de filtres de convolution couramment utilisés en traitement d'image 52

Figure 27 : Illustration de méthode de segmentation 53

Figure 28 : Modèle de perceptron à une couche 54

Figure 29 : Architecture U-Net Schéma 56

Figure 30 : Représentation du muscle squelettique 60

Figure 31 : Organisation hiérarchique du réseau vasculaire associé à une myofibre squelettique 60

Figure 32 : Organisation longitudinale du muscle squelettique 61

Figure 33 : Représentation d'une structure mitochondriale 63

Figure 34 : Connectivité du réseau mitochondrial dans les muscles de souris 63

Figure 35 : Représentations des trois types d'autophagie 66

Figure 36 : Le complexe de protéines associé à la dystrophine 69

Figure 37 : Histologie comparée de muscle sain et dystrophique *70*
Figure 38 : Evaluation histologique de l'expression de l'enzyme eNOS *71*
Figure 39 : Représentation schématique de l'accumulation de glycogène au sein de la cellule *74*
Figure 40 : Corrélation du phénotype de la maladie de Pompe en fonction du niveau d'activité de l'enzyme GAA *75*
Figure 41 : Surcharge en glycogène mise en évidence par la coloration Periodic Acid-Schiff *76*
Figure 42 : Altération du processus autophagique et désorganisation cellulaire *77*
Figure 43 : Représentation des altérations du flux autophagique *78*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison de techniques de super-résolution 32

Tableau 2 : Comparaison de système d'imagerie en profondeur 39

Tableau 3 : Comparaison de différentes techniques de transparisition 42

Tableau 4 : Caractéristiques des différents types de fibre musculaire 65

Liste des abréviations

2PA : *Two-Photon Absorption* (absorption à deux photons)

2PEF : *Two-Photon Excited Fluorescence* (fluorescence excitée à deux photons)

3PA : *Three-Photon Absorption* (absorption à trois photons)

3PEF: *Three-Photon Excited Fluorescence* (fluorescence excitée à trois photons)

ATP : *Adenosine Triphosphate*

DMD : *Duchenne Muscular Dystrophy*

DNA-PAINT : *DNA-based Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography*

eNOS : *Endothelial Nitric Oxide Synthase*

FAD : *Flavin Adenine Dinucleotide*

GAA : *Acid α-Glucosidase*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

ISM : *Imaging Scanning Microscope*

LAMP : *Lysosome-Associated Membrane Protein*

Mdx : Dystrophin-deficient model

MEC : *Matrice Extracellulaire*

NADH : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced form)*

NADPH : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced form)*

NOS : *Nitric Oxide Synthase*

OPO : *Optical Parametric Oscillator*

PSF : *Point Spread Function*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SHG : Second Harmonic Generation (génération de seconde harmonique)

SPIM : *Selective Plane Illumination Microscopy* (microscopie à illumination plane sélective)

STED : *Stimulated Emission Depletion Microscopy*

STORM : *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*

THG : *Third Harmonic Generation* (génération de troisième harmonique)

TIM : *Translocase of the Inner Mitochondrial membrane*

TOM : *Translocase of the Outer Mitochondrial membrane*

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Avant-propos

Explorer un tissu biologique, c'est plonger dans un univers où chaque échelle de l'organe à l'organite révèle une facette unique d'une organisation d'une complexité remarquable. Cette exploration soulève des questions fondamentales : comment un tissu sain maintient-il son architecture ? Comment celle-ci est-elle modifiée dans le contexte d'une maladie ? Et surtout, comment relier les phénomènes observés macroscopiquement avec les altérations qui se jouent au niveau subcellulaire ?

Dans les maladies neuromusculaires, ces interrogations prennent une résonance particulière. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique récessive, provoquée par la mutation du gène codant la dystrophine, une protéine essentielle à la stabilité de la fibre musculaire *(Bonilla et al., 1988; Bushby, 1992)*. En son absence, le tissu musculaire subit de profondes transformations : destruction (ou nécrose) des fibres, fibrose, adipose, désorganisation architecturale et altérations vasculaires *(Desguerre et al., 2009a; Duan et al., 2021)*. Ces modifications, inscrites dans un espace tridimensionnel (3D) et temporel, conduisent progressivement à une perte de motricité sévère et à un décès prématuré, souvent autour de 20-30 ans. La maladie de Pompe, quant à elle, est une maladie de surcharge lysosomale due à un déficit en α-glucosidase acide, entraînant l'accumulation de glycogène dans les lysosomes *(Raben et al., 2010, 2002)*. Cette surcharge perturbe l'intégrité des organites et modifie la dynamique d'autres structures cellulaires, telles que les vacuoles autophagiques *(Fukuda et al., 2006b; Raben et al., 2010)*. Les mitochondries, bien connues comme étant les « usines énergétiques » de la cellule, jouent également un rôle central dans la signalisation et l'homéostasie cellulaire *(Lee-Glover et al., 2025)*. Si leur implication dans la maladie de Pompe a longtemps été reléguée au second plan, des travaux ont révélé des altérations fonctionnelles et morphologiques dans des fibroblastes *(Lim et al., 2015)*. Toutefois, à l'échelle de la fibre musculaire et dans la progression de la maladie, de nombreuses zones d'ombre subsistent.

L'observation de ces processus nécessite des techniques capables de « sonder » le tissu à très grande résolution. Or, chaque modalité d'imagerie possède ses limites : les méthodes histologiques classiques offrent une vision d'ensemble mais limitées à un plan fin d'environ 10 µm. La microscopie confocale, bien qu'efficace, est restreinte à une profondeur d'imagerie d'environ 50 µm, ne permettant pas d'avoir une vision globale de l'état du tissu.

Face à ces contraintes, une opportunité pourrait être de combiner plusieurs modalités d'imagerie et de créer des passerelles entre les échelles. C'est précisément ce que propose l'approche corrélative *(Pelicci et al., 2023)*. Elle consiste à acquérir des images à différentes échelles avec des techniques complémentaires, puis à les relier spatialement avec précision. En pratique, cela signifie cartographier un tissu, repérer des zones d'intérêt, puis revenir les observer au niveau subcellulaire tout en garantissant que les structures visualisées sont rigoureusement les mêmes. Cette stratégie ouvre la voie à une compréhension véritablement multi-échelle des phénomènes biologiques, essentielle pour étudier des

maladies où les altérations visibles à l'échelle macroscopique trouvent leur origine dans des dysfonctionnements cellulaires ou moléculaires *(Bucana et al., 1976; Franks et al., 2017).*

Le travail expérimental présenté dans ce manuscrit vise deux principaux objectifs :

Sur le plan biologique : décrire et quantifier les altérations vasculaires et la fibrose dans la DMD, ainsi que les perturbations mitochondriales et lysosomales dans la maladie de Pompe.

Sur le plan technologique : développer des méthodes de quantification 2D et 3D adaptées aux tissus entiers, et mettre en place une solution corrélative capable de relier observations méso et microscopiques.

Pour répondre à ces objectifs, deux stratégies expérimentales principales ont été mises en œuvre. Pour la DMD, un modèle de rat DMD^{mdx} a été étudié par microscopie multiphotonique sur des échantillons musculaires transparisés, permettant la reconstruction 3D de la fibrose et du réseau vasculaire et l'extraction de paramètres morphologiques quantitatifs. Pour la maladie de Pompe, un modèle murin Gaa$^{-/-}$ a été exploré en microscopie super-résolution, afin de caractériser finement l'architecture mitochondriale et lysosomale, avec des analyses ciblant la morphologie et les interactions subcellulaires.

Ces deux volets sont reliés par un troisième axe : le développement d'un outil de transfert de repères entre microscopes photoniques. Cette innovation permet de passer d'une imagerie tissulaire sur microscope droit à une observation ciblée en super-résolution sur microscope inversé, assurant la continuité spatiale entre acquisitions et rendant possible l'étude corrélative d'une même structure à différentes échelles.

Ainsi, ce travail propose une intégration spatiale et analytique complète, appliquée à deux modèles pathologiques. En associant préparation d'échantillons pour l'imagerie 3D profonde, approches de super-résolution, méthodes avancées d'analyse d'images et outils de transformation de coordonnées, il offre un nouveau regard sur l'organisation musculaire et ses altérations. Au-delà de ces applications spécifiques, il établit également un *pipeline* reproductible et adaptable à d'autres contextes biologiques.

Cet avant-propos esquisse les grandes lignes de la démarche et les enjeux de ce travail. Les chapitres suivants présenteront d'abord les concepts et les méthodes mobilisés pour explorer les tissus à différentes échelles, détailleront les résultats obtenus sur les modèles de la DMD et de la maladie de Pompe, et finalement discuterons des perspectives offertes par l'imagerie corrélative dans l'étude des maladies neuromusculaires.

Contexte scientifique

L'exploration des tissus biologiques a profondément évolué depuis l'invention du microscope au XVIIe siècle, marquant un tournant décisif dans les sciences du vivant. Ainsi, Robert Hooke décrivait pour la 1re fois en 1665 des « cellules » dans une tranche de liège *("Robert Hooke's Micrographia of 1665 and 1667," 2010)*, tandis qu'Antoni van Leeuwenhoek, observait quelques années plus tard, des organismes unicellulaires grâce à des microscopes artisanaux *(van Leeuwenhoek, 1932)*. Ces découvertes fondatrices ont posé les bases de la cytologie et de l'histologie, disciplines qui se sont progressivement enrichies au XIXe siècle grâce aux travaux de Xavier Bichat *(Bichat, 1801)*. Celui-ci proposa une première classification des tissus selon leurs structures et leurs fonctions qui permis d'appréhender l'organisation du vivant comme un système hiérarchisé, allant du niveau macroscopique de l'organe jusqu'au niveau subcellulaire des organites.

Dans ce 1er chapitre, nous présenterons un état de l'art des modalités d'imagerie en microscopie photonique, selon un spectre allant de l'imagerie mésoscopique à celle super-résolue et qui permet respectivement d'explorer un organe entier ou de caractériser des structures à l'échelle de l'organite.

I. Imagerie multi-échelle et multimodale en microscopie photonique

I.1. Signaux analysés en microscopie photonique

Les signaux exploités en microscopie photonique résultent de l'interaction lumière-matière, via des phénomènes d'absorption, d'émission ou de diffusion. Chacun de ces processus génère des contrastes spécifiques, renseignant sur la structure, la composition ou l'activité biologique des échantillons. L'analyse conjointe de plusieurs signaux constitue la base de l'imagerie multimodale, en fournissant une lecture complémentaire, souvent multi-échelle, du vivant. Cette section présente les principaux types de signaux optiques utilisés en microscopie pour l'imagerie tissulaire.

I.1.1. La fluorescence

Le phénomène de fluorescence a été observé pour la 1re fois en 1845 par John Herschel, qui décrivit l'émission de lumière bleue par une solution de quinine exposée à la lumière solaire *(Herschel, 1845)*, Ce phénomène fut ensuite formalisé en 1852 par Sir George Gabriel Stokes, qui démontra la capacité de certains matériaux, tels que la fluorite ou le verre dopé à l'uranium, à convertir un rayonnement ultraviolet invisible en lumière visible. Il introduisit à cette occasion le terme « fluorescence » et décrivit le décalage spectral entre l'excitation et l'émission (voir **Figure 1**.b), aujourd'hui connu sous le nom de « déplacement de Stokes » *(Stockes, 1852)*. Ce déplacement constitue la base de la détection sélective du signal fluorescent, en permettant de discriminer efficacement la lumière émise de l'excitation des structures ou molécules d'intérêt dans des échantillons biologiques *(Lakowicz, 2006a)*.

I.1.1.1. Fluorescence à 1 photon (1P)

L'absorption désigne la capacité d'un composé à capter l'énergie E d'un rayonnement lumineux incident à une longueur d'onde donnée λ. Dans le cadre des interactions lumière-matière, la lumière peut être décrite d'une part comme une onde électromagnétique, constituée d'un champ électrique $\vec{E}$ et d'un champ magnétique $\vec{B}$ oscillants et perpendiculaires l'un à l'autre, et d'autre part comme un flux de particules élémentaires, des photons. Chaque photon ne possède aucune masse mais porte une énergie définie par la relation $E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$ exprimé en joule (J), avec la constante de Planck $h = 6{,}626 \times 10^{-34}\, J \cdot s$, ν la fréquence associée, la célérité de la lumière dans le vide $c = 3 \cdot 10^{8} m.s^{-1}$ et λ la longueur d'onde du rayonnement. Ainsi, lorsqu'un photon interagit avec une molécule, il peut être absorbé si son énergie correspond à la différence entre deux de ces niveaux quantiques.

En effet, les molécules possèdent des niveaux d'énergie discrets, qui résultent de la configuration quantique de leurs électrons. Ces niveaux peuvent être regroupés selon des orbitales électroniques. (S_0 pour l'état fondamental, S_1, S_2 pour les états excités, etc.), eux-mêmes subdivisés en niveaux vibrationnels et rotationnels *(Lakowicz, 2006a)*. Lorsque la molécule absorbe un photon, un électron passe de l'état fondamental S_0 vers un niveau excité S_1 ou supérieur (transition électronique).

Ce processus est généralement suivi d'une relaxation non radiative vers le niveau vibrationnel le plus bas de S_1, puis d'un retour à l'état fondamental S_0 via :

- Fluorescence : émission de photon lors du retour de $S_1 \longmapsto S_0$. Ce phénomène se produit sur une échelle de temps rapide, avec un temps de vie (τ) de l'ordre de la nanoseconde (10^{-9}).
- Phosphorescence : transition radiative plus lente impliquant un changement de spin, généralement depuis un état triplet $T_1 \longmapsto S_0$, dont le temps de vie associé est beaucoup plus long, variant de la microseconde ($10^{-6}\, s$) à la seconde, voire davantage selon l'environnement moléculaire.

Ce comportement est schématisé par un diagramme de Jablonski, qui illustre les transitions électroniques, les relaxations internes, et les émissions lumineuses associées (**Figure 1**.a.)

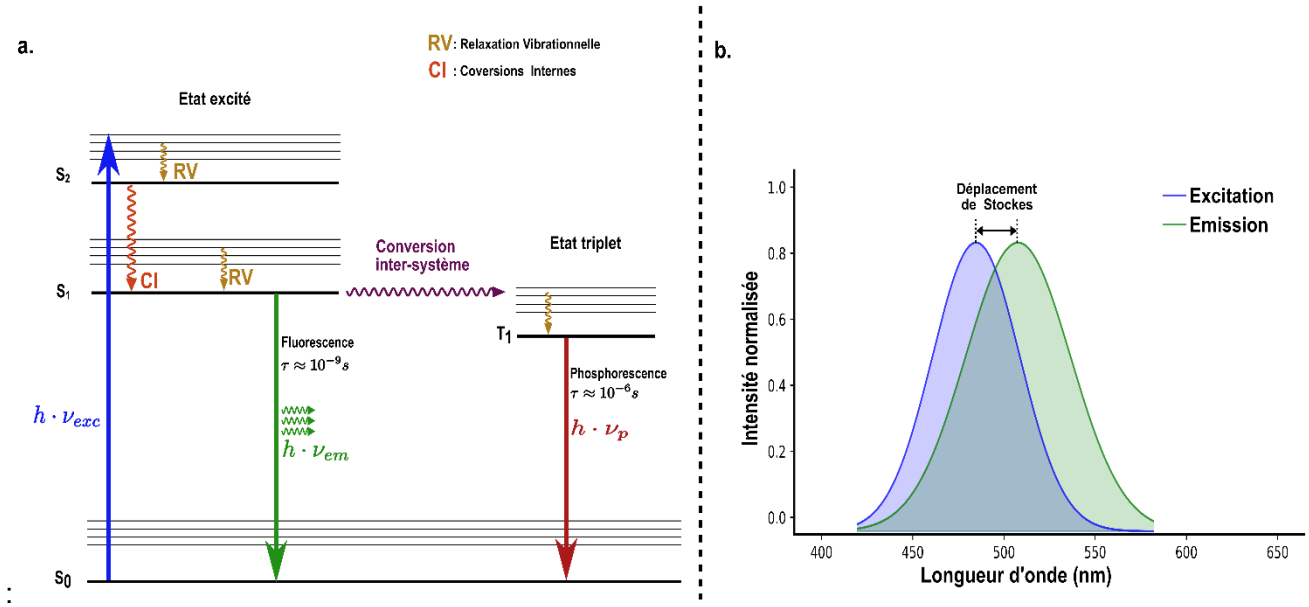


Figure 1 : Représentation des principes de la fluorescence. *a. Le diagramme de Jablonski illustre les différentes transitions électroniques d'un fluorophore : absorption d'un photon (excitation), relaxation non radiative, puis émission d'un photon de plus faible énergie (fluorescence). b. Les spectres typiques d'excitation (en bleu) et d'émission (en vert) d'un fluorophore mettent en évidence le déplacement de Stokes, c'est-à-dire la différence en longueur d'onde entre la position du pic d'absorption et du pic d'émission. Adapté* de *(Lichtman and Conchello, 2005; Dunst and Tomancak, 2019; Lakowicz, 2006).*

I.1.1.2. Fluorescence à 2 photons (2P)

L'absorption biphotonique (2P) repose sur une interaction non linéaire entre la lumière et la matière, au cours de laquelle un fluorophore est excité par l'absorption quasi-simultanée (~1 femtoseconde, fs, soit 10^{-15} s) de deux photons de moindre énergie (généralement dans l'infrarouge proche). La somme des énergies de ces deux photons correspond à celle nécessaire pour atteindre un état électronique excité. Ce phénomène a été théorisé en 1931 par Maria Goeppert-Mayer, pionnière de la physique quantique, qui a posé les bases du formalisme mathématique de l'absorption multiphotonique *(Göppert-Mayer, 1931)*. Elle fut récompensée par le prix Nobel de physique en 1963, bien que les implications expérimentales de ses travaux ne soient devenues accessibles qu'avec le développement des lasers impulsionnels femtoseconde dans les années 1990, permettant d'atteindre les intensités de photons nécessaires pour provoquer ce type d'interaction *(Katzir et al., 2013; Masters and So, 2004).*

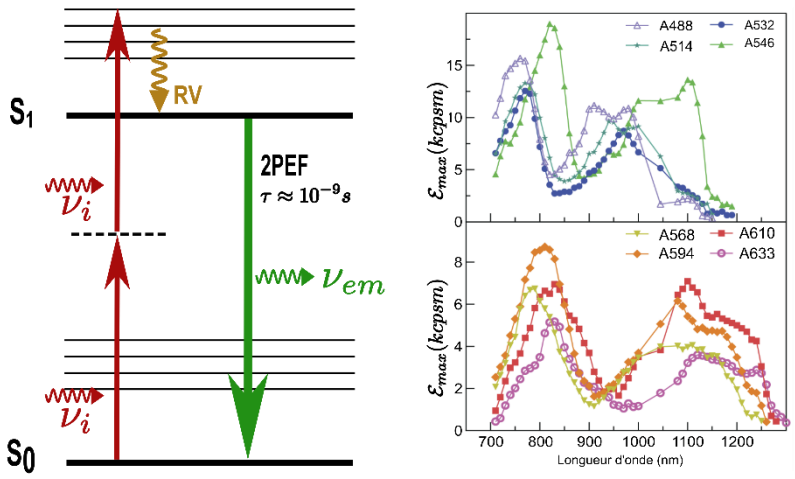


Figure 2:* Illustration des principes de l'excitation biphotonique**. *À gauche : diagramme de Jablonski représentant le mécanisme d'excitation à deux photons (2PEF-Two-Photon Excitation Fluorescence). Deux photons d'infrarouge proche (IR) sont absorbés quasi-simultanément pour exciter la molécule vers un état électronique supérieur, suivi de l'émission d'un photon fluorescent de plus haute énergie que chaque photon incident.* ***RV : Relaxation vibrationnelle*. À droite : spectres d'absorption biphotonique de fluorophores classiques, Les spectres 2P sont plus larges, asymétriques d'après Lang and Spring, 2021.*

L'absorption 2P présente des spectres non linéaires qui diffèrent significativement de leurs spectres d'absorptions mono-photoniques classiques (**Figure 2**) *(Drobizhev et al., 2009; Pelosi et al., 2023)*.

Contrairement à une simple transposition des spectres au double de la longueur d'onde, les profils biphotoniques sont souvent plus larges, asymétriques, et peuvent être décalés par rapport aux longueurs d'onde attendues. Ce décalage spectral résulte de la nature intrinsèquement non linéaire du processus d'absorption biphotonique. Notamment en raison de transitions vibroniques amplifiées dans le cadre de l'absorption biphotonique, conduisant à des profils spectroscopiques plus larges, asymétriques *(Drobizhev et al., 2012).*

I.1.1.3. Fluorescence à 3 photons (3P)

L'excitation tri-photonique (3P) est un processus non linéaire d'ordre trois, dans lequel trois photons de faible énergie (généralement dans l'infrarouge moyen, $\lambda \approx 1300 - 1700\, nm$) sont absorbés de manière quasi-simultanée par une molécule fluorescente pour provoquer une transition vers un état électronique excité (**Figure 3**). Ce phénomène repose sur une interaction photonique qui dépend de l'intensité instantanée du champ électrique au cube (I^3), ce qui implique que l'excitation est fortement confinée au volume focal, tant spatialement que temporellement, plus qu'en 2P.

Par rapport à l'excitation biphotonique (2P), l'utilisation de longueurs d'onde plus longues présente plusieurs avantages : réduction de la diffusion des milieux, pénétration accrue dans les tissus épais, ce qui en fait une modalité adaptée à l'imagerie *in vivo* de structures profondes, notamment dans le cerveau de rongeur *(Horton et al., 2013; Ouzounov et al., 2017).*

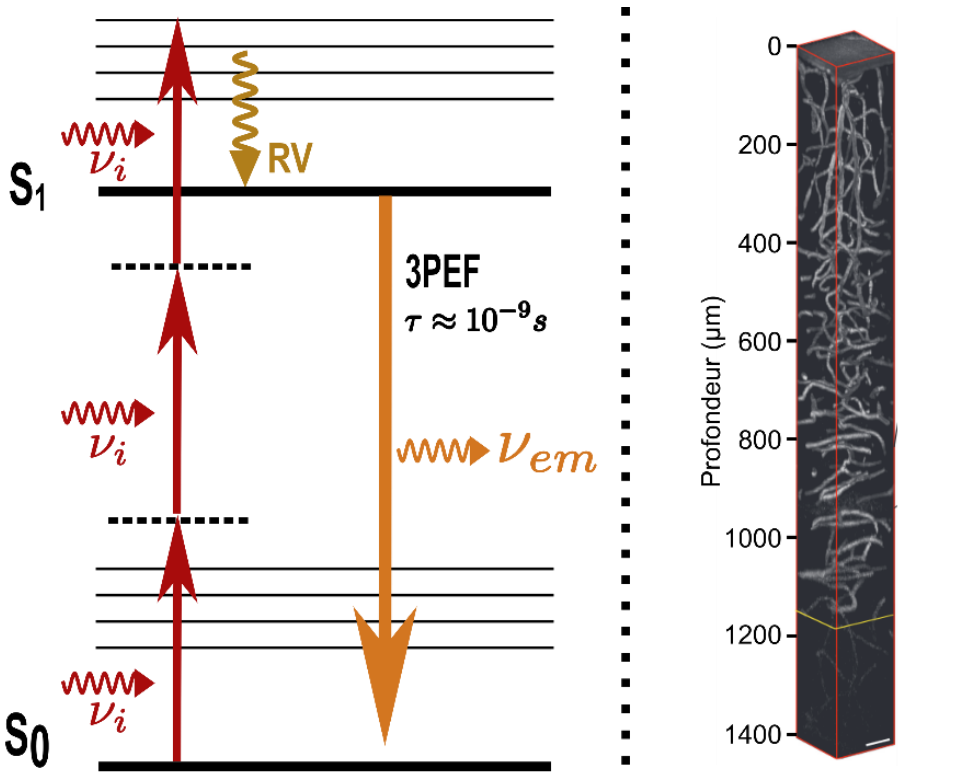


Figure 3 : ***Absorption 3 photon. Gauche : Diagramme de Jablonski de l'absorption 3P.*** *RV : Relaxation vibrationnelle. Droite : Image in-vivo de la vascularisation de cerveau de souris marqué dextran-Texas-Red. Excitation à 1700 nm et un pas de Z de 4 µm, filtre long-pass 593 nm. D'après Horton et al., 2013*

I.1.1.4. Propriétés des fluorophores

L'exploitation du phénomène de fluorescence permet une visualisation spécifique des structures cellulaires, la cartographie spatiale de biomolécules, ainsi que le suivi en temps réel de processus dynamiques dans des cellules vivantes *(Chen et al., 2020; Sepúlveda-Ramírez et al., 2019; Yang et al., 2021)*. Bien que certaines structures biologiques présentent une autofluorescence intrinsèque *(Manno et al., 2022)*, la microscopie à fluorescence repose principalement sur l'utilisation de protéines fluorescentes exprimées génétiquement *(Chalfie et al., 1994; Parhamifar et al., 2014)* ou de fluorophores synthétiques.

La performance d'un fluorophore dépend ainsi non seulement de ses propriétés photophysiques intrinsèques, mais aussi de son environnement. Ainsi, le rendement quantique (Θ), défini comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés, détermine l'efficacité de l'émission lumineuse. Le coefficient d'extinction molaire (ε), exprimé en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, mesure quant à lui la capacité d'absorption du fluorophore. La brillance intrinsèque est définie par le produit de ces deux paramètres ($\varepsilon \cdot \Theta$). Enfin, le temps de vie de fluorescence (τ) correspond à la durée moyenne qu'une molécule passe dans l'état excité avant de revenir à l'état fondamental. Ce processus, de nature stochastique, se produit à l'échelle de la nanoseconde (ns).

Certaines applications sont particulièrement sensibles à ces paramètres, comme le *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET). Ce phénomène repose sur un transfert d'énergie non radiatif entre un fluorophore donneur excité et un fluorophore accepteur situé à proximité immédiate (>10 nm), lorsque le spectre d'émission du donneur chevauche celui d'absorption de l'accepteur.

L'efficacité du FRET, notée E, est définie par l'équation :$E = \frac{R_0^6}{R_0^6+R^6}$ où R est la distance entre le donneur et l'accepteur et R_0 est la distance de Förster, correspondant à la distance pour laquelle l'efficacité du FRET est de 50%. La valeur de R_0 (exprimée en nanomètres) est déterminée par les propriétés spectrales du couple donneur/accepteur et de leur environnement. Elle se calcule selon l'équation suivante :

$R_0 = 0.02108\left(\kappa^2 \cdot \Theta\mathrm{D} \cdot \mathrm{n}^{-4}\left(\int_0^\infty f_D(\lambda) \cdot \mathcal{E}_{\mathcal{A}} \cdot (\lambda) \cdot \lambda^4 \, d\lambda\right)\right)^{1/6}$, avec κ^2 est le facteur d'orientation dipolaire entre le donneur et l'accepteur, n est l'indice de réfraction du milieu, ΘD est le rendement quantique de fluorescence du donneur et l'intégrale représente le recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur $\left(f_D(\lambda)\right)$ et le spectre d'absorption de l'accepteur $(\varepsilon_A(\lambda))$.

Ainsi, le FRET dépend étroitement des propriétés photophysiques des fluorophores et de leur environnement optique *(Lakowicz, 2006b).* Cette sensibilité confère à la méthode une précision nanométrique, qui en fait un outil de choix pour l'étude des interactions protéine-protéine, de la dynamique conformationnelle de protéines en réponse à un stimulus, ou encore de divers processus biochimiques intracellulaires. Elle a également ouvert la voie au développement de biosenseurs capables de rapporter en temps réel des variations spécifiques de l'environnement cellulaire, comme la concentration en ions calcium ou l'activation de protéines particulières *(Berta et al., 2024; Mancini and Rizzo, 2024; Bertolin et al., 2016, 2018)*.

Cette approche, souligne à quel point la fluorescence est sensible à son environnement immédiat. Lorsqu'on transpose ces approches à l'imagerie tissulaire, cette dépendance devient encore plus marquée: le pH, la concentration en ions métalliques ou calciques, ainsi que la présence d'espèces réactives de l'oxygène, peuvent altérer l'émission des fluorophores en induisant des phénomènes de *quenching (Lakowicz, 2006c).* Par ailleurs, la photodégradation irréversible (*photobleaching*), exacerbée par une illumination répétée ou intense, constitue une contrainte supplémentaire.

I.1.1.5. Fluorescence intrinsèque

Outre l'autofluorescence globale de certains tissus, souvent exploitée en biologie végétale, plusieurs biomolécules présentent des propriétés fluorescentes naturelles, permettant une imagerie sans marquage exogène. Parmi les fluorophores endogènes les plus étudiés, on retrouve :

Le nicotinamide adénine dinucléotide réduit [NAD(P)H] et le flavine adénine dinucléotide (FAD) sont deux cofacteurs endogènes majeurs des réactions d'oxydo-réduction, jouant un rôle central dans les voies métaboliques cellulaires. Le NAD(P)H intervient principalement dans la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale, tandis que le FAD participe à de nombreuses réactions d'oxydation, notamment au cours de la β-oxydation des acides gras et du cycle de Krebs.

Ces molécules présentent des propriétés optiques distinctes qui permettent leur différenciation en imagerie de fluorescence. La forme réduite du NAD(P)H est fluorescente, dont un des pic d'absorption est autour de 340 nm en excitation monophotonique, un pic d'émission centré vers 460 nm et un temps de vie court en milieu aqueux (~0,3-0,7 ns) *(Blacker and Duchen, 2016; Visser and Hoek, 1981)*. À l'inverse, la forme oxydée (NAD^+/$NADP^+$) ne présente pas de fluorescence détectable. En microscopie 2P, le NAD(P)H peut être excité de manière optimale aux alentours de 740 nm, ce qui permet de l'exploiter comme sonde endogène pour l'imagerie métabolique *(Huang et al., 2002; Varone et al., 2014)*.

À l'inverse, le FAD est fluorescent sous sa forme oxydée, présentant un maximum d'absorption autour de 450 nm, un pic d'émission centré vers 525 nm et un temps de vie plus long (~2,3 ns), avec une excitation biphotonique optimale entre 850 et 900 nm *(Bugarski et al., 2018)*.

Ainsi, le rapport NAD(P)H/FAD, couramment désigné sous le terme *optical redox ratio*, constitue un indicateur non invasif de l'activité métabolique cellulaire, permettant d'évaluer l'équilibre entre voies cataboliques et anaboliques *(Georgakoudi and Quinn, 2023)*. Cet indicateur présente un intérêt particulier pour l'étude en temps réel de processus physiopathologiques dynamiques, tels que la progression du cancer épithélial *(Varone et al., 2014)*, les réponses inflammatoires *(Jones et al., 2018)*, ou encore les processus de différenciation cellulaire *(Stringari et al., 2017)*.

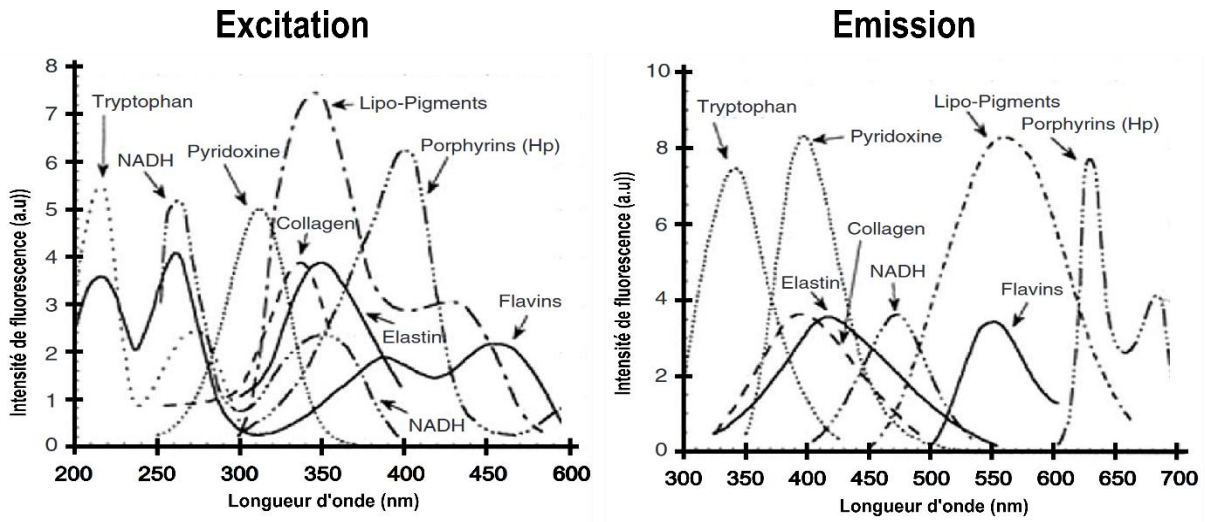


Figure 4 : Spectres d'excitation et d'émission des principaux fluorophores endogènes. *D'après Monici, 2005*

Outre le NAD(P)H et le FAD, d'autres fluorophores intrinsèques peuvent être exploités en imagerie (**Figure 4**). Le collagène, en particulier de type I, présente une autofluorescence marquée, principalement sous excitation dans l'ultraviolet, et est largement utilisé pour l'imagerie du tissu conjonctif *(Saletnik et al., 2023)*. L'élastine, autre composant majeur de la matrice extracellulaire, présente également une fluorescence intrinsèque détectable dans les tissus conjonctifs et vasculaires *(Monici, 2005)*. Enfin, les lipo-pigments, tels que la lipofuscine, s'accumulent progressivement au cours du vieillissement ou en réponse à un stress oxydatif, et émettent une fluorescence caractéristique dans le domaine spectral allant du visible au rouge proche *(Monici, 2005)*.

Ces fluorophores endogènes, bien que généralement moins intenses que les sondes fluorescentes exogènes, présentent l'avantage majeur de fournir un contraste intrinsèque, sans nécessiter de marquage préalable.

I.1.1.6. Fluorescence extrinsèque

Toutes les structures biologiques ou moléculaires d'intérêt ne présentent pas de fluorescence intrinsèque exploitable, ou bien leur autofluorescence naturelle s'avère trop faible, peu spécifique ou inadaptée aux objectifs expérimentaux. Pour pallier ces limitations, deux grandes familles de sondes fluorescentes capables de marquer spécifiquement des cibles biologiques, sont principalement utilisées : les protéines fluorescentes et les fluorophores synthétiques.

I.1.1.6.1. Protéines fluorescentes

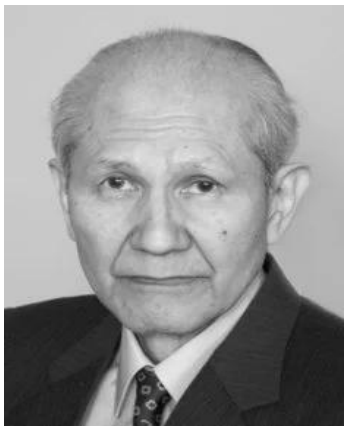


***Figure 5** : **Portrait d'Osamu Shimomura**. Via Nobel prize*

L'introduction des protéines fluorescentes en biologie cellulaire a marqué un tournant majeur. En 1962, le chercheur japonais Osamu Shimomura, récompensé par le prix Nobel de chimie en 2008 aux côtés de Martin Chalfie et Roger Tsien, isola et caractérisa pour la 1re fois la protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*, GFP) à partir de la méduse *Aequorea victoria* *(Shimomura et al., 1962)*. Le séquençage complet de la GFP en 1992, suivi de son expression hétérologue dans des cellules vivantes en 1994, a ouvert la voie au développement de nombreux variants génétiquement modifiés couvrant une large gamme spectrale, allant du bleu au rouge lointain *(Chalfie et al., 1994)*. L'une des caractéristiques remarquables de la GFP, et plus généralement des protéines fluorescentes dérivées, réside dans le fait que le chromophore se forme spontanément lors du repliement de la chaîne polypeptidique, sans besoin de cofacteurs exogènes ni de modifications enzymatiques supplémentaires. Cette propriété rend ces protéines particulièrement adaptées à une large gamme d'applications en biologie cellulaire et moléculaire, telles que le suivi dynamique de protéines d'intérêt, l'étude des interactions

moléculaires (par exemple via FRET), ou encore la visualisation de processus physiopathologiques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. *(Cohen and Fox, 2001; Pham et al., 2012)*.

En outre, des protéines fluorescentes génétiquement encodées ont été conçues comme senseurs capables de rapporter des variations intracellulaires d'ions, en particulier du calcium, un 2nd messager central dans la signalisation cellulaire. Des variants comme le cameleon *(Miyawaki et al., 1997)* ou encore les GCaMPs *(Chen et al., 2013; Nakai et al., 2001)* exploitent des mécanismes basés sur le FRET ou sur la modulation directe de la fluorescence, permettant un suivi spatiotemporel précis des fluctuations calciques dans des cellules vivantes et des tissus.

I.1.1.6.2. Fluorophores synthétiques

En complément des protéines fluorescentes, les fluorophores synthétiques représentent une classe d'agents de contraste essentielle en microscopie. De petite taille (<1 kDa), ils peuvent être facilement conjugués à divers vecteurs (anticorps, lectines, oligonucléotides…), offrant une grande flexibilité pour le marquage spécifique de structures cellulaires ou tissulaires. Leurs propriétés photophysiques en font des outils puissants : spectre d'excitation/émission couvrant une large gamme, rendement quantique élevé, forte photostabilité, et une grande diversité de familles chimiques. Parmi les plus utilisées, les sondes de type Alexa Fluor ou Atto se distinguent par leur robustesse et leur compatibilité avec des applications exigeantes comme l'imagerie multiparamétrique, la cytométrie ou le multiplexing (notamment avec la technologie OPAL)

Certaines sondes présentent des propriétés particulièrement adaptées à des usages spécifiques. Les fluorophores optimisés pour le microscope *Stimulated Emission Depletion* (STED) sont conçus pour résister à l'illumination intense nécessaire à cette technique et permettent ainsi d'atteindre des résolutions nanométriques en imagerie cellulaire et tissulaire. D'autres fluorophores, tels que les Alexa Fluor 647 ou Atto 647, présentent un comportement de *blinking* exploité en microscopie de super-résolution de type STORM ou PALM *(Heilemann et al., 2009)*.

Plus récemment, des polymères fluorescents biocompatibles, émettant dans le rouge lointain, ont été développés pour le marquage de cellules dans des tissus ou organes fortement autofluorescents *(Daniel et al., 2020)*. Certains de ces polymères peuvent également être greffés avec des fluorophores tels qu'Alexa Fluor 647 et fonctionnalisés avec des groupements chimiques spécifiques, par exemple une forte affinité pour la nucléoline, permettant leur utilisation en imagerie de super-résolution (STORM) *(Fabre et al., 2022).*

I.1.2. Signaux harmoniques

I.1.2.1. Génération de Seconde Harmonique (SHG)

L'excitation biphotonique permet d'accéder à d'autres modalités de contraste non linéaire, en complément de la fluorescence 2P *(Lacin and Yildirim, 2024)*. Parmi celles-ci, la génération de seconde harmonique (*Second Harmonic Generation*, SHG) est l'une des plus exploitées en imagerie biologique *(Bianchini and Diaspro, 2008; Strupler et al., 2007)*. Ce phénomène, découvert en 1961 par P. A. Franken, a été adapté à l'imagerie biologique par Samuel Roth et Isaac Freund *(Lim, 2019)*. Contrairement à la fluorescence, la SHG est un processus cohérent, élastique et non dissipatif. C'est-à-dire que les photons générés conservent une relation de phase, rendant la SHG particulièrement sensible à l'organisation spatiale (orientation par exemple) des molécules ou des structures. Concrètement, deux photons incidents de fréquence identique (ν) interagissent simultanément avec une structure organisée pour donner naissance à un photon unique de fréquence doublée (2ν). Ce mécanisme ne modifie pas l'énergie globale, la matière ne subissant aucune perte nette au cours du processus *(Hilzenrat et al., 2022)*. Contrairement aux phénomènes d'absorption ou d'émission, la SHG n'entraîne ni dissipation d'énergie, ni photodégradation.

La SHG ne peut se produire que dans des structures non-centrosymétriques, où les dipôles moléculaires sont orientés de manière cohérente et anisotrope. Cette contrainte physique en fait une méthode idéale pour l'imagerie sans marquage de structures fibrillaires ordonnées. Le caractère directionnel et non photoblanchissant du signal SHG en fait une technique complémentaire de la fluorescence multiphotonique, particulièrement adaptée à l'analyse structurelle sans marquage (**Figure 6**).

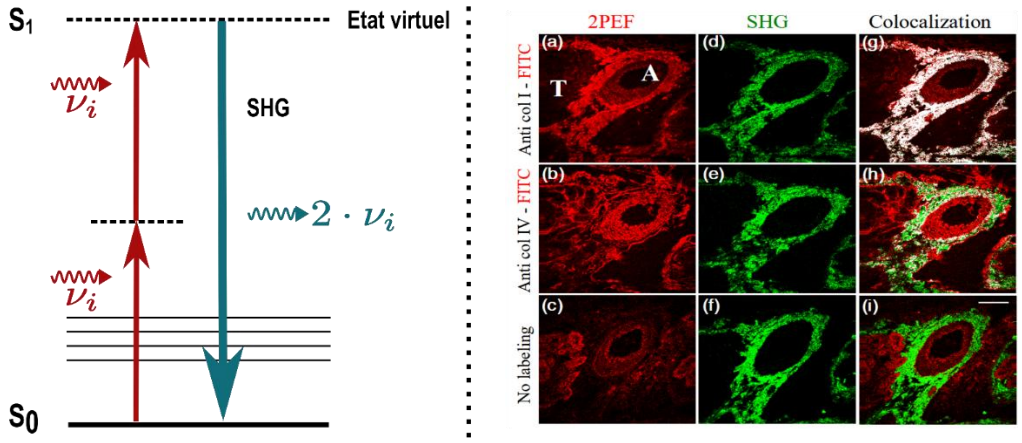


Figure 6 : ***Comparaison des signaux de fluorescence biphotonique (2PEF) et de génération de seconde harmonique (SHG) dans une artère rénale de souris****. Gauche : Diagramme de Jablonski de la SHG. Droite : (a–c) Imagerie en fluorescence biphotonique de différents fluorophores marquant les structures vasculaires. (d–f) Signal SHG révélant l'organisation du collagène fibrillaire. (g–i) Superposition des canaux 2PEF et SHG, montrant une émission SHG spécifique au collagène de type I, caractéristique de la tunique adventice de l'artère, tandis que le collagène de type IV, présent dans la lame basale, ne génère pas de signal SHG. D'après Strupler et al., 2007*

I.1.2.2. Génération de Troisième Harmonique (THG)

La génération de troisième harmonique (*Third Harmonic Generation*, THG) est un autre processus d'optique non linéaire utilisé en imagerie multiphotonique. Elle repose sur l'interaction cohérente de trois photons incidents de même fréquence (υ), conduisant à l'émission d'un photon unique de fréquence triplée (3υ). Contrairement à la SHG, la THG ne nécessite pas de structures non-centrosymétriques, mais repose sur l'hétérogénéité des indices de réfractions dans la zone focale, telles que des interfaces entre milieux d'indices de réfraction différents *(Weigelin et al., 2016)*. La génération efficace d'un signal THG dépend de deux paramètres clés :

- La variation locale de l'indice de réfraction, qui agit comme source de contraste,
- La troisième susceptibilité non linéaire du milieu traversé, noté $\chi(3)$ décrit la réponse non linéaire d'un matériau à un champ électrique intense. Elle est responsable de divers phénomènes optiques, tels que la génération de troisième harmonique

La THG offre un contraste intrinsèque sans marquage qui complète les signaux issus de la fluorescence, élargissant ainsi les capacités d'exploration *label-free* des tissus. Par ailleurs, la dépendance du signal THG à la polarisation du faisceau incident (**Figure 7**) constitue une source d'information supplémentaire sur l'organisation structurale du tissu. Il a notamment été démontré que cette propriété permettait d'évaluer le degré de myélinisation en fonction du diamètre axonal chez l'embryon de poisson zèbre, illustrant ainsi le potentiel de la THG pour des études quantitatives de la microarchitecture neuronale (*Morizet et al., 2025)*.

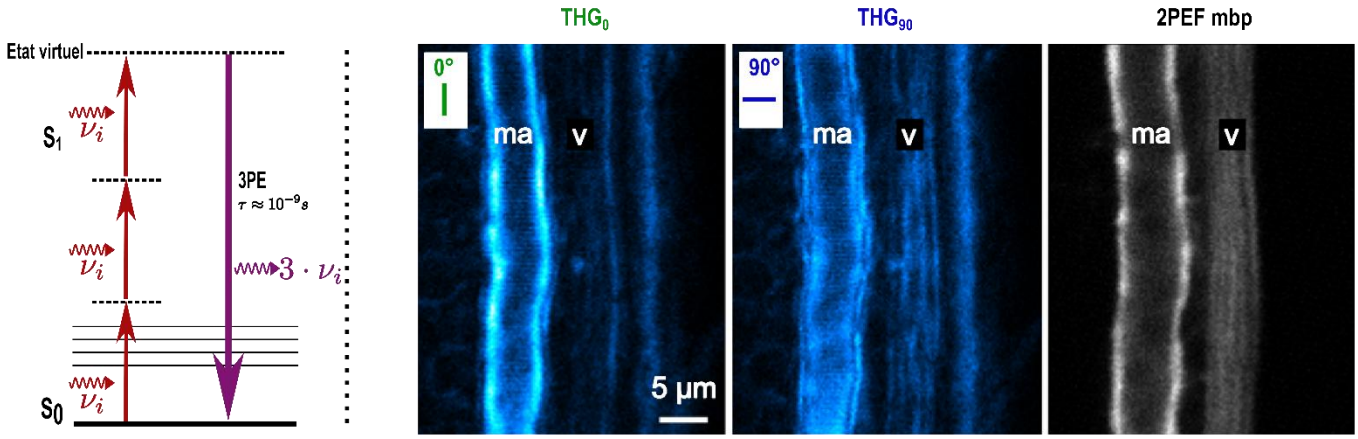


Figure 7 : Génération de troisième harmonique (THG) et dépendance à la polarisation*. À gauche : schéma simplifié du diagramme de Jablonski illustrant le processus de génération de THG par interaction cohérente de trois photons incidents conduisant à l'émission d'un photon de fréquence triplée. À droite : images de microscopie THG de myéline provenant de la moelle épinière d'embryon de poisson zèbre avec une polarisation linéaire du faisceau incident orientée successivement à 0° et 90°, suivies d'une image en fluorescence biphotonique (2PEF) du marquage spécifique de la myéline. Une dépendance marquée du signal THG à l'orientation de la polarisation est observée. D'après (Morizet et al., 2025)*

I.1.2.1. Les harmonophores en biologie

Le terme harmonophore désigne toute entité moléculaire ou structurelle capable de générer un signal optique par un processus de génération harmonique, tel que la SHG. À la différence des fluorophores, qui absorbent puis ré-émettent la lumière après un temps de relaxation (processus dissipatif), les harmonophores n'émettent pas de fluorescence, mais produisent un signal cohérent par diffusion non linéaire instantanée, sans perte d'énergie ni émission retardée.

Les harmonophores majeurs capables de générer un signal SHG comprennent le collagène de type I *(Cicchi et al., 2013)* (**Figure 6**), les microtubules *(Bancelin et al., 2017),* les bandes de myosine présentes dans les fibres musculaires *(Odin et al., 2008)*, ainsi que l'amylopectine de l'amidon *(Castanha et al., 2023)* et la cellulose cristalline *(Glas et al., 2015)*, et ce sans recours à des marqueurs exogènes.

Outre les structures biologiques endogènes (collagène, myosine, etc.), des nanoparticules non centrosymétriques ont été développées pour agir comme sources artificielles de SHG *in vivo* (**Figure 8**). Ces nano-harmonophores souvent à base de cristaux non linéaires comme le $BaTiO_3$, le $LiNbO_3$ ou certains composés dopés présentent une forte efficacité de génération harmonique et peuvent être fonctionnalisés pour cibler des biomolécules spécifiques (antigènes, récepteurs, etc.) ou des types cellulaires. Contrairement aux sondes fluorescentes, ces agents ne photoblanchissent pas et offrent un signal stable, orienté et sans bruit de fond spectral, ce qui les rend particulièrement prometteurs pour des applications de suivi longue durée ou de suivi cellulaire *in vivo* en milieu complexe *(Dubreil et al., 2017; Pantazis et al., 2010; Ramos-Gomes et al., 2019).*

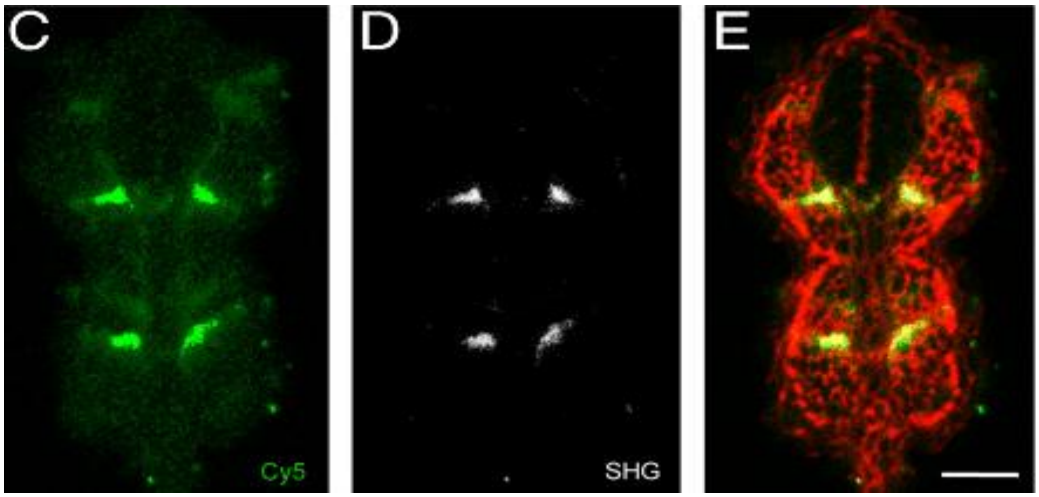


Figure 8 : Signal SHG de nanoparticules couplées à un anticorps secondaire dans un tronc de poisson-zèbre*. Immunomarquage de la dystrophine dans une coupe transversale de tronc de larve de zebrafish (gauche), utilisant un anticorps secondaire conjugué à une nanoparticule génératrice de seconde harmonique (SHG). Gauche : canal de fluorescence du secondaire couplé au fluorophore Cy5. Centre : signal SHG des nanoparticules détecté autour de 410 nm ($\lambda_{exc} = 820\ nm$). Droite : image superposition combinant fluorescence Cy5 et SHG. Le signal SHG, présente un rapport signal sur bruit (SNR) supérieur à celui du fluorophore. D'après (Pantazis et al., 2010)*

La THG repose sur la sensibilité aux variations abruptes d'indice de réfraction, permettant de visualiser sans marquage des structures biologiques présentant une forte hétérogénéité optique. Parmi les harmonophores identifiés, la myéline constitue une cible privilégiée en raison de son organisation lipidique dense et anisotrope *(H. Lim et al., 2014).* De même, les membranes mitochondriales, riches en lipides et fortement compartimentées, génèrent un signal THG *(Barzda et al., 2005)*. Les gouttelettes lipidiques et autres compartiments cellulaires à haute teneur lipidique sont également sources d'un signal THG marqué *(Débarre et al., 2006; Tserevelakis et al., 2014)*. Par ailleurs, la porosité osseuse, caractérisée par des interfaces solides/liquides multiples, produit un contraste THG exploitable pour l'imagerie tissulaire *(Genthial et al., 2017)*. Enfin, certains compartiments intracellulaires présentant une forte hétérogénéité optique contribuent également à la génération de signaux THG, offrant un outil précieux pour l'analyse structurale fine des cellules *(Pajić et al., 2022)*.

I.2. Résolution en microscopie à fluorescence

I.2.1. Critère de Rayleigh

L'imagerie en fluorescence repose sur des principes optiques fondamentaux, au premier rang desquels figure le pouvoir de résolution du microscope, c'est-à-dire sa capacité à distinguer deux points proches comme étant séparés. Cette limite est généralement définie par le critère de Rayleigh *(Dunst and Tomancak, 2019)*, selon lequel deux sources ponctuelles sont considérées comme résolues lorsque le maximum d'intensité de l'une coïncide avec le premier minimum de diffraction de l'autre (**Figure 9**). D'autres formulations existent, notamment le critère d'Abbe, souvent utilisé pour caractériser cette limite en microscopie optique. Dans la suite de ce manuscrit, nous adopterons le critère de Rayleigh pour exprimer la résolution.

Ce critère découle directement de la nature ondulatoire de la lumière et définit une barrière physique imposée par la diffraction. La distance minimale d permettant de distinguer deux points dans le plan image est donnée par l'expression : $\boldsymbol{d = \frac{0.61 * \lambda}{NA}}$. Où λ est la longueur d'onde d'émission, et NA (ouverture numérique) est une propriété intrinsèque de l'objectif (**Figure 9**). Plus NA est élevée, plus le système est capable de collecter la lumière issue de différentes directions, et donc de résoudre des compartiments cellulaires fins. Ce principe fixe ainsi une limite théorique à la résolution latérale, typiquement autour de 200–250 nm pour les microscopes à fluorescence.

En microscopie non-linéaire, la résolution spatiale est intimement liée au volume d'excitation, puisque l'absorption multiphotonique est confinée à la focalisation du faisceau. En théorie, la résolution d'un microscope multiphotonique est inférieure à celle d'un microscope confocal, d'environ un facteur 1,4 à 2, en raison de l'utilisation de longueurs d'onde plus longues. Cependant, cette comparaison est à nuancer. Dans des échantillons fortement diffusants (comme les tissus opaques ou non clarifiés), la résolution effective du microscope multiphotonique peut être supérieure à celle du microscope confocal,

du fait de la meilleure pénétration optique et de la moindre sensibilité à la diffusion *(Centonze and White, 1998; Periasamy et al., 1999)*. L'estimation du volume d'excitation et donc de la fonction d'étalement du point (*Point Spread Function*, PSF) est complexe et dépend de nombreux paramètres : ouverture numérique, indice de réfraction, longueur d'onde, nombre de photons collectés par pixel, dispersion temporelle, etc. Une approximation analytique de la PSF a été proposée par *Zipfel et al., 2003 :*

$$Résolution\ latérale\ \omega_{xy} = \begin{cases} \frac{0{,}320\lambda}{\sqrt{2}NA} \text{ si NA} \leq 0{,}7 \\ \frac{0{,}325\lambda}{\sqrt{2}NA^{0{,}91}} \text{ si NA} > 0{,}7 \end{cases} \text{ et } Résolution\ axiale\ \omega_z = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}}\left[\frac{1}{n-\sqrt{n^2-NA^2}}\right]$$

avec λ à la longueur d'onde d'excitation, NA, l'ouverture numérique de l'objectif et n correspondant à l'indice d'immersion de l'objectif, d'après *(Zipfel et al., 2003).*

I.2.1. Fonction d'étalement du point (PSF)

En pratique, un point lumineux n'est jamais observé comme une source ponctuelle parfaite, mais comme une distribution 3D de lumière appelée fonction d'étalement du point (*Point Spread Function*, PSF) *(Dunst and Tomancak, 2019)*. La PSF représente la réponse impulsionnelle du système optique à une source ponctuelle idéale : elle résume l'effet de la diffraction et des propriétés de l'optique (objectif, aberrations, ouverture, etc.) sur l'image formée. Cette fonction est composée, d'un lobe central intense, représentant la zone principale de focalisation. Ce lobe central est entouré de lobes secondaires plus faibles, qui traduisent les interférences diffractives, avec une anisotropie marquée entre les axes : la résolution est généralement meilleure dans le plan latéral (XY) que dans l'axe axial (Z), où la PSF est plus étalée. Cette anisotropie est particulièrement prononcée en microscopie à fluorescence épifluorescence ou confocale, où la résolution axiale est en général 2 à 3 fois inférieure à la résolution latérale. La connaissance de la PSF est importante pour les traitements post-acquisition ou alors d'autres formes d'imageries avancée visant à améliorer la résolution.

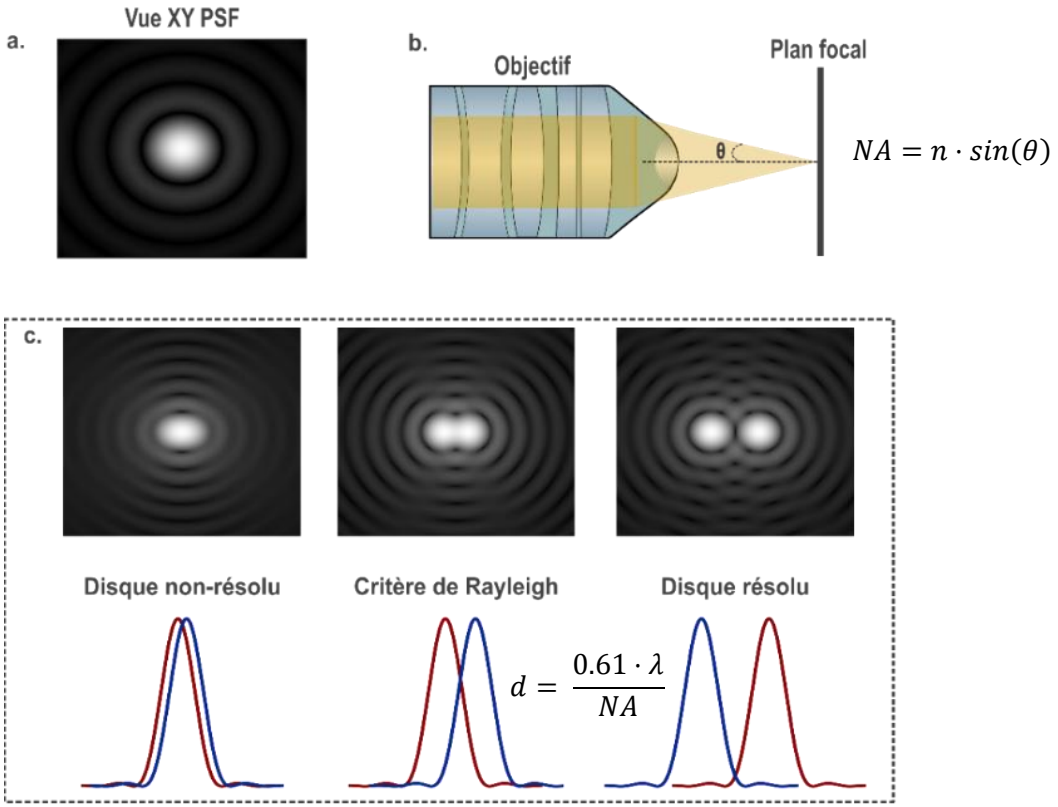


Figure 9 *: **Représentation de la fonction d'étalement du point (PSF) et du calcul de la limite de diffraction**. a. PSF en vue XY, représenté par une tache de diffraction avec des lobes secondaires. b. Illustration d'un objectif de microscope traversé par un faisceau et calcul de l'ouverture numérique (NA). c. Représentation de la limite de diffraction selon le critère de Rayleigh. Adapté de Dunst and Tomancak, 2019*

I.3. Imagerie multi-échelle en microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence offre la possibilité d'explorer les structures biologiques sur un large éventail d'échelles spatiales, allant de la résolution classique d'environ 250 nm, limitée par la diffraction de la lumière, jusqu'à des résolutions sub-diffractionnelles pouvant atteindre quelques dizaines de nanomètres, grâce aux techniques de super-résolution *(Liu et al., 2022)*. Différentes modalités microscopiques couvrent cette gamme d'échelles : la microscopie confocale, adaptée à l'imagerie 3D avec une résolution sub-micrométrique, permet d'obtenir des reconstructions volumétriques. À l'autre extrémité, les techniques de microscopie à feuille de lumière (*lightsheet*) offrent une imagerie rapide, peu phototoxique et volumique à l'échelle du tissu entier ou de l'organe. Ces approches combinées permettent une exploration multi-échelle intégrée, essentielle pour comprendre l'organisation structurale et fonctionnelle des systèmes biologiques complexes (**Figure 10**).

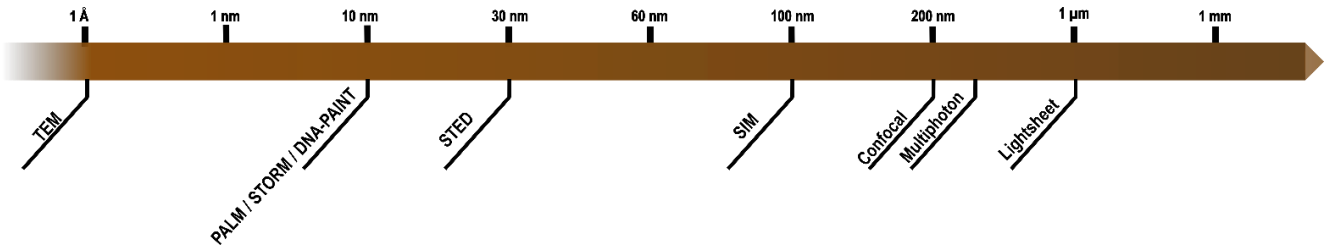


Figure 10 *: **Résolutions et gammes d'observation des principaux systèmes de microscopie.** Illustration des approches allant de la microscopie à feuillet de lumière (**LSFM**, Light Sheet Fluorescence Microscopy), confocale et multiphotonique, jusqu'aux techniques de super-résolution (**STED**, Stimulated Emission Depletion ; **SIM**, Structured Illumination Microscopy ; **PALM**, PhotoActivated Localization Microscopy ; **STORM**, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy ; **DNA-PAINT**, DNA-based Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) et à la microscopie électronique en transmission (**TEM**, Transmission Electron Microscopy). Adapté de Gallegos-Cerda et al., 2023*

I.3.1. Microscope confocal à balayage laser

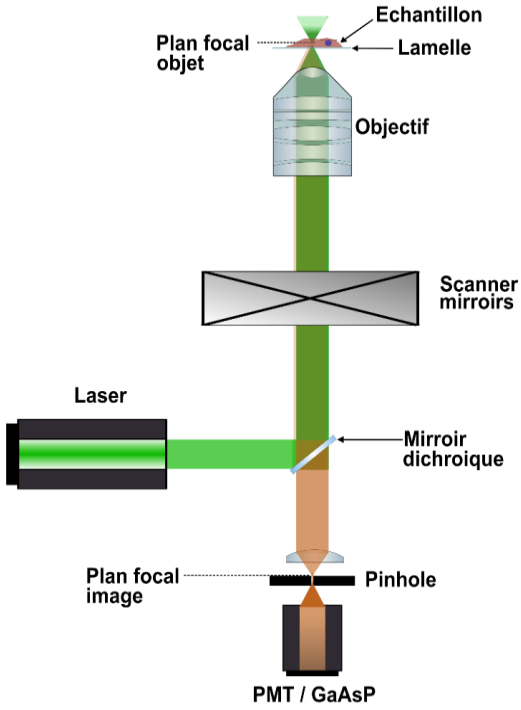


Figure 11 *: **Schéma du chemin optique d'un microscope confocal**. Le faisceau laser, dirigé par des miroirs dichroïques et des lentilles de focalisation, est concentré sur un point précis de l'échantillon à l'aide d'un objectif à haute ouverture numérique. La fluorescence émise est collectée par le même objectif, puis passe à travers le pinhole, qui rejette le signal hors focus. Un détecteur (généralement un photomultiplicateur ou un détecteur hybride) enregistre l'intensité du signal point par point, pendant que le faisceau est balayé sur toute la surface de l'échantillon. La reconstruction numérique du balayage permet d'obtenir une image 2D ou 3D à haute résolution optique. Adapté de Diaspro and Bianchini, 2020.*

Le microscope confocal à balayage laser est l'une des techniques d'imagerie en fluorescence les plus largement utilisées pour l'étude des structures cellulaires et tissulaires *(Elliott, 2020)*. Le confocal utilise des sources lumineuses cohérentes, généralement des lasers, permettant une excitation ciblée et focalisée des fluorophores. Le faisceau laser est acheminé vers l'échantillon par l'intermédiaire d'un système de balayage assuré par des miroirs galvanométriques, qui déplacent le point focal dans les plans X et Y de manière séquentielle. Un miroir dichroïque redirige le faisceau d'excitation à travers l'objectif vers le plan focal de l'échantillon. La fluorescence émise est collectée par le même objectif, retraverse le miroir dichroïque, puis est focalisée à travers un diaphragme circulaire appelé pinhole, positionné dans un plan optique conjugué au foyer de l'objectif (**Figure 11**) *(Paddock, 2000)*.

Le pinhole joue un rôle central dans le fonctionnement du microscope confocal en assurant le rejet des signaux hors focus : il bloque les photons provenant des plans situés au-dessus et en dessous du plan focal, ce qui améliore à la fois le contraste de l'image et sa résolution. Ce principe de sectionnement optique permet ainsi d'acquérir des images correspondant à des coupes optiques fines, chacune à une profondeur donnée. L'enregistrement successif de ces plans à

différentes profondeurs (stack Z) autorise une reconstruction tridimensionnelle du volume observé. La lumière transmise à travers le pinhole est ensuite détectée par des photomultiplicateurs (PMT), ou, dans les systèmes les plus performants, par des détecteurs plus sensibles comme les photomultiplicateurs *GaAsP*, qui présentent un rendement quantique supérieur et une meilleure capacité de détection des signaux faibles. En théorie, un microscope confocal permet d'atteindre une résolution latérale d'environ 200 nm, et d'imager des structures situées jusqu'à 50 µm de profondeur dans des tissus biologiques sans perte significative de contraste *(Jonkman and Brown, 2015a; Paddock, 2000)*.

I.3.2. Approches super-résolutions

La résolution limitée par la diffraction a longtemps représenté une barrière fondamentale en microscopie optique conventionnelle, notamment en microscopie confocale, où la résolution latérale est restreinte à environ 200 nm *(Heintzmann and Ficz, 2013)*. Cette contrainte physique, formulée initialement par Ernst Abbe, stipule qu'il est impossible de distinguer deux objets séparés par une distance inférieure à environ la moitié de la longueur d'onde de la lumière utilisée, en raison de la nature ondulatoire de celle-ci. En conséquence, de nombreuses structures subcellulaires ou assemblages moléculaires tels que les complexes protéiques, les pores nucléaires ou certaines structures membranaires échappent à l'observation directe avec les méthodes optiques classiques. C'est pour surmonter cette limite de diffraction que plusieurs approches dites de super-résolution ont émergé depuis les années 2000, permettant d'accéder à une résolution latérale bien en-deçà de la limite de diffraction décrit par Abbe *(Betzig et al., 2006; Hell and Wichmann, 1994)*. Elles ouvrent la voie à une exploration nanoscopique, sans recourir à l'imagerie électronique. Elles reposent sur des principes physiques variés, allant de la modulation spatiale de l'illumination à la localisation stochastique de fluorophores

I.3.2.1. Approche basée sur le ré-assignement de pixel : image scanning microscope (ISM)

L'amélioration de la résolution en microscopie optique s'est toujours heurtée à un compromis fondamental entre la finesse spatiale et l'intensité du signal collecté. Sur un microscope confocal classique, la réduction du pinhole en dessous de 1 unité d'ouverture (AU), environs 0,7 AU, permet théoriquement un gain modeste en résolution. Cependant, cette optimisation s'accompagne d'une perte drastique du signal lumineux, limitant fortement la sensibilité, en particulier lorsque l'échantillon est faiblement fluorescent *(James B Pawley, 2006)*.

En 2010, Müller et Enderlein ont proposé la première démonstration expérimentale de la microscopie à balayage d'image (*Image Scanning Microscopy*, ISM), en remplaçant le détecteur ponctuel classique par une caméra EMCCD *(Müller and Enderlein, 2010)*. Cette configuration a validé expérimentalement la possibilité d'augmenter la résolution latérale au-delà de la limite confocale d'un facteur de $\sqrt{2}$. Cependant, l'un des inconvénients majeurs de cette implémentation initiale réside dans la

lenteur de l'acquisition : chaque position du spot focal nécessite l'enregistrement d'une image complète par la caméra, et les temps de lecture de l'EMCCD, induisent des durées d'acquisition de 25 s pour une image de quelques 2×2 µm.

Des progrès décisifs ont été réalisés, notamment grâce aux travaux de Schulz, qui ont démontré la possibilité d'implémenter l'ISM sur un microscope confocal à disque de rotatif (*Spinning disk*) *(Schulz et al., 2013)*. L'ISM repose sur la capture d'un signal spatialement décalé, chaque pixel de la caméra enregistrant une image légèrement différente du foyer. Cette redondance spatiale permet de reconstruire une image enrichie en hautes fréquences spatiales, étendant ainsi la bande passante jusqu'à un facteur $\sqrt{2}$. La reconstruction finale de l'image s'effectue via un algorithme de réassignement, qui recentre virtuellement les photons détectés en fonction de leur position sur la caméra ce qui équivaut à recentrer la PSF.

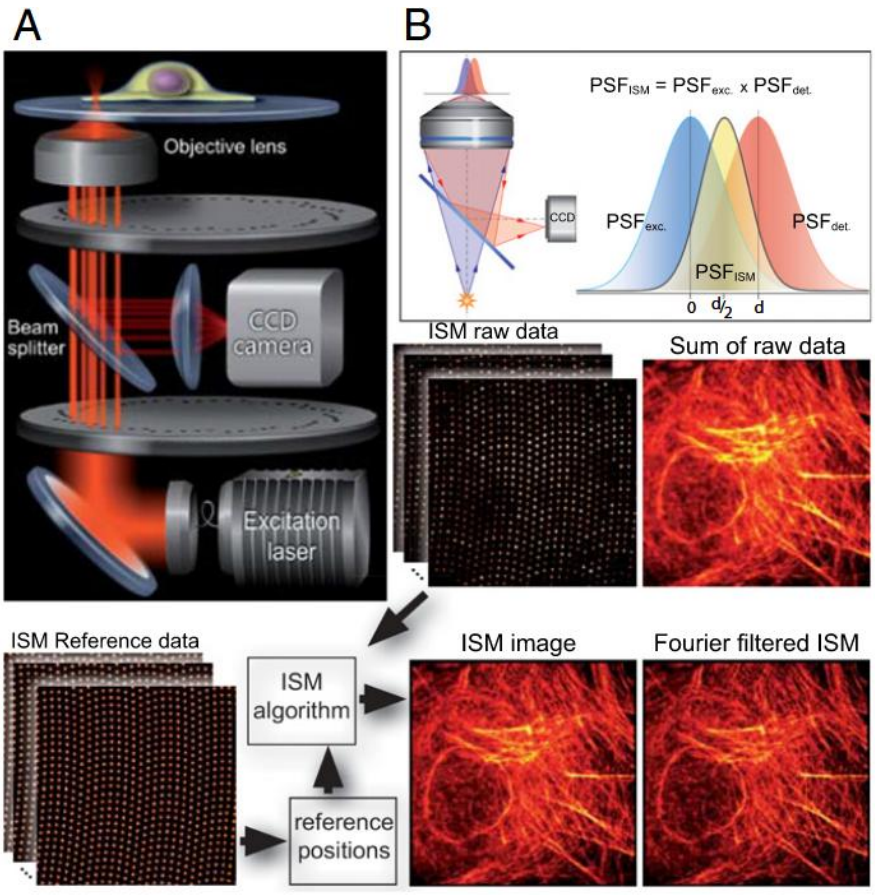


Figure 12 : ***Principe de l'Image Scanning Microscopy (ISM) spinning disk****. A. Schéma optique du système : un laser est couplé à un disque de Nipkow, équipé de microlentilles permettant une excitation multifocale rapide. B. Illustration du principe de détection par caméra : chaque pixel enregistre une image légèrement décalée du foyer, correspondant au produit de la PSF d'excitation et de détection. Les images brutes sont ensuite combinées : par sommation des signaux, par application d'un algorithme de ré-assignement qui recentre les photons détectés, puis par un traitement dans l'espace de Fourier, cela permet d'accroître la bande passante spatiale et d'améliorer la résolution finale de l'image ISM. D'après Schulz et al., 2013*

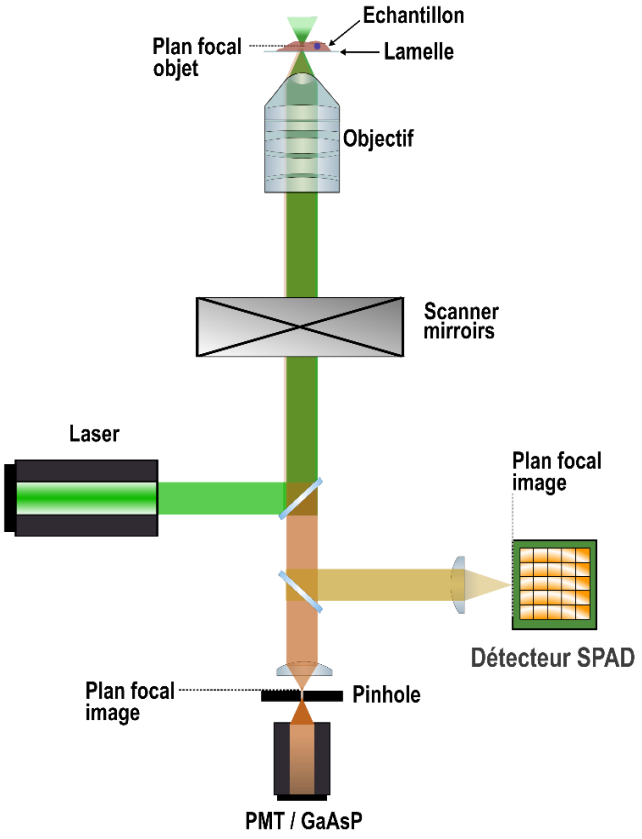


Figure 13 : ***Schéma du chemin optique d'un microscope confocal ISM.*** *Le système repose sur une base confocale classique, mais le signal émis est redirigé vers une matrice de détecteurs SPAD à la place du détecteur ponctuel (PMT ou GaAsP). Adapté de Diaspro and Bianchini, 2020.*

La technologie ISM, telle qu'elle est utilisée aujourd'hui, repose sur les principes établis par les travaux de Schulz et al *(Buttafava et al., 2020; Huff, 2015; Schulz et al., 2013)*. Elle s'appuie sur une architecture de microscope confocal classique, à ceci près que le diaphragme (pinhole) est entièrement ouvert afin de collecter l'ensemble des photons émis, sans en rejeter comme dans le mode confocal strict. Toutefois, au lieu d'un détecteur ponctuel classique (PMT ou GaAsP), le signal est dirigé vers une matrice de détecteurs sensibles (**Figure 13**), tels que des réseaux SPAD (*Single Photon Avalanche Diodes*) ou des capteurs multiéléments GaAsP, dont chaque élément correspond typiquement à une ouverture équivalente à 0,2 unité d'ouverture (AU) *(Buttafava et al., 2020; Castello et al., 2019; Huff, 2015)*. À chaque position de balayage du faisceau focal, un ensemble de pixels est ainsi collecté : chacun fournit une information spatiale légèrement décalée, créant une redondance exploitable pour la reconstruction. Un algorithme de réattribution spatiale (*pixel reassignment*) est ensuite appliqué *(Castello et al., 2019)*. Celui-ci repose sur une connaissance précise de la PSF d'excitation et de détection, et permet de repositionner les photons détectés au plus près de leur origine optique réelle. Cette stratégie permet d'augmenter la résolution latérale théorique (un facteur de $\sqrt{2}$), tout en préservant l'efficacité de détection lumineuse, à la différence de la microscopie confocale classique qui sacrifie du signal pour gagner en résolution *(Buttafava et al., 2020)*. L'ISM constitue ainsi un compromis optimal entre résolution, sensibilité et rapidité, la rendant particulièrement attractive pour l'imagerie biologique à haute résolution, notamment dans le contexte de l'exploration subcellulaire des tissus biologiques.

I.3.2.2. Microscopie à illumination structurée

Une autre technique de super-résolution est la microscopie à illumination structurée (*Structured Illumination Microscopy*, SIM) qui repose sur l'utilisation d'un motif d'illumination modulé spatialement (généralement des franges sinusoïdales ou motif lattice), projeté sur l'échantillon *(Gustafsson, 2005)*. Lorsque ce motif interagit avec les structures sous-jacentes de l'échantillon, il en résulte un phénomène de battement optique (moiré) générant des fréquences spatiales mixtes. Celles-ci contiennent de l'information au-delà de la limite de résolution imposée par la diffraction.

En analysant ces motifs d'interférence à travers une série de prises d'images acquises avec différentes orientations et phases du motif d'illumination, il devient possible, de reconstruire une image haute résolution, via un traitement numérique approprié (généralement basé sur une transformée de Fourier inversée) *(Gustafsson, 2005; Heintzmann and Huser, 2017)*. Cette approche permet ainsi d'augmenter la résolution latérale et axiale par rapport à une microscopie à fluorescence conventionnelle, atteignant typiquement une résolution de ~100 nm en XY et ~250 nm en Z.

Introduite pour la première fois au début des années 2000 par Gustafsson, le microscope à illumination structurée (SIM) a connu de nombreuses évolutions technologiques *(Gustafsson, 2000)*. Des variantes telles que le fast-SIM ou le live-SIM ont notamment rendu cette technique compatible avec l'observation de processus dynamiques dans des cellules vivantes, grâce à des cadences d'acquisition rapides et une illumination moins agressive *(Fiolka et al., 2012; Kner et al., 2009)*. Contrairement à d'autres approches de super-résolution telles que le STED ou STORM, SIM présente l'avantage de ne pas nécessiter de fluorophores photo-activables ou de fortes puissances laser, ce qui en fait une méthode relativement non phototoxique et donc particulièrement adaptée à l'imagerie *in vitro* ou *in vivo* *(Schermelleh et al., 2019, 2010)*.

I.3.2.3. Imagerie par localisation de molécules uniques (SMLM)

Les techniques regroupées sous le terme de SMLM (*Single Molecule Localization Microscopy*) ont marqué une avancée majeure en microscopie optique. Contrairement aux approches qui modifient globalement le mode d'illumination ou de détection, les méthodes de SMLM permettent de dépasser la limite de diffraction en localisant avec une précision nanométrique chaque fluorophore activé de manière stochastique *(Betzig et al., 2006; Rust et al., 2006)*. Parmi ces techniques, on trouve notamment STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), PALM (*PhotoActivated Localization Microscopy*), et DNA-PAINT (*Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography*), qui partagent une même philosophie : isoler spatialement l'émission de quelques fluorophores par cycle d'acquisition, puis reconstruire une image super-résolue par accumulation de milliers de cycles d'activation et de localisation.

Chaque événement d'émission isolé est alors localisé avec une précision typique de 10 à 30 nm, ce qui permet de dépasser largement la limite de diffraction imposée par la microscopie optique

conventionnelle. L'image super-résolue est ensuite reconstituée par accumulation de milliers de cycles successifs (**Figure 14**). Grâce à cette approche, des résolutions latérales de 20 à 30 nm et axiales de 50 à 60 nm peuvent être atteintes *(Betzig et al., 2006; Jungmann et al., 2014; Rust et al., 2006)*.

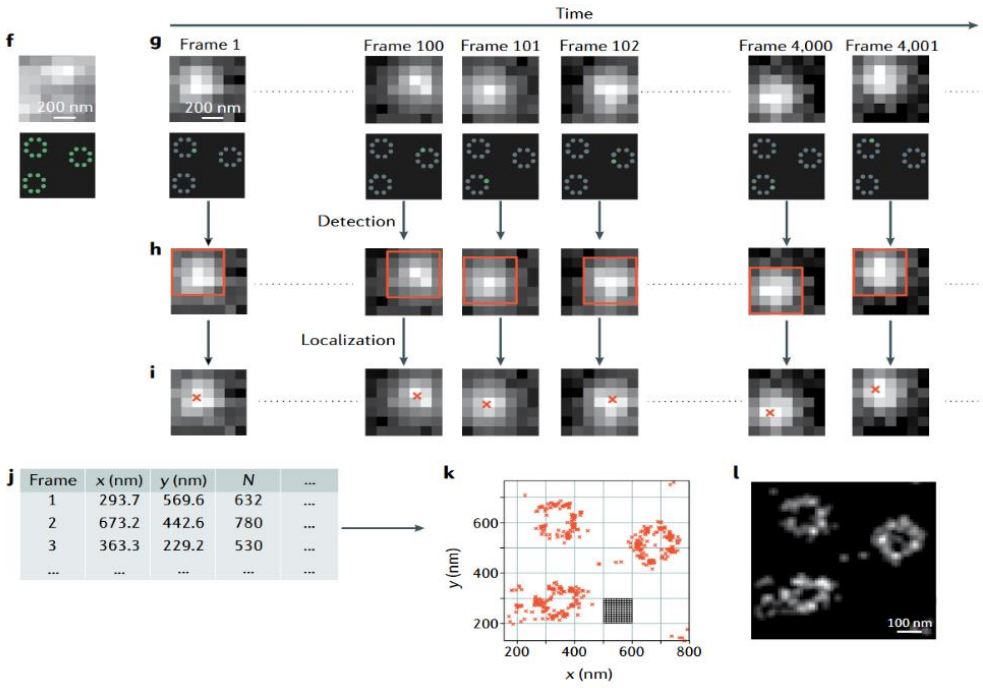


***Figure 14* : Principe de la microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM).** *f. Représentation expérimentale d'un complexe de pore nucléaire imagé par SMLM. g. Séquence temporelle d'acquisition d'images montrant l'émission stochastique de différents fluorophores activés au fil du temps. h. Étape de détection des spots de fluorescence individuels sur chaque image brute. i. Localisation précise des fluorophores par ajustement gaussien de chaque point détecté, permettant d'atteindre une précision nanométrique. j. Données de localisation accumulées. k. Représentation brute de l'ensemble des localisations moléculaires. l. Image super-résolue reconstruite à partir des données de localisation, via convolution gaussienne centrée sur chaque molécule détectée. D'après Lelek et al., 2021*

La méthode STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), introduite en 2006, repose sur l'activation et la désactivation cyclique de fluorophores « photoswitchables » dans un environnement chimique contrôlé, typiquement en présence de tampons réducteurs et oxydants *(Rust et al., 2006)*. Dans sa version originale, la microscopie STORM utilise une stratégie à deux fluorophores : un activateur (par exemple Cy3) et un rapporteur (comme Alexa Fluor 647 ou Cy5, cf. **Figure 15**). Lors d'une illumination intense du rapporteur ($\lambda \approx 640$ nm, typiquement ~10-30 kW/cm²), celui-ci entre brièvement dans un état fluorescent, puis passe rapidement dans un état sombre (*dark state*) non-radiatif *(Lelek et al., 2021)*.

L'illumination à une longueur d'onde plus courte (par exemple $\lambda \approx 488$ nm), correspondant à l'excitation de l'activateur, permet de ramener aléatoirement une petite fraction des fluorophores rapporteurs à leur état fluorescent actif. Ce mécanisme repose sur des interactions photo-induites entre l'activateur et le rapporteur.

À chaque cycle ON/OFF, un seul fluorophore (ou un petit nombre, spatialement séparés) est activé, émet un signal fluorescent, puis retourne à l'état sombre. Chaque émission peut alors être localisée avec une précision nanométrique (10–30 nm). Ce cycle est répété des milliers de fois, permettant de reconstruire une image super-résolue à partir de l'accumulation de milliers d'événements de localisation, jusqu'à photoblanchiment irréversible *(Bates et al., 2013)*.

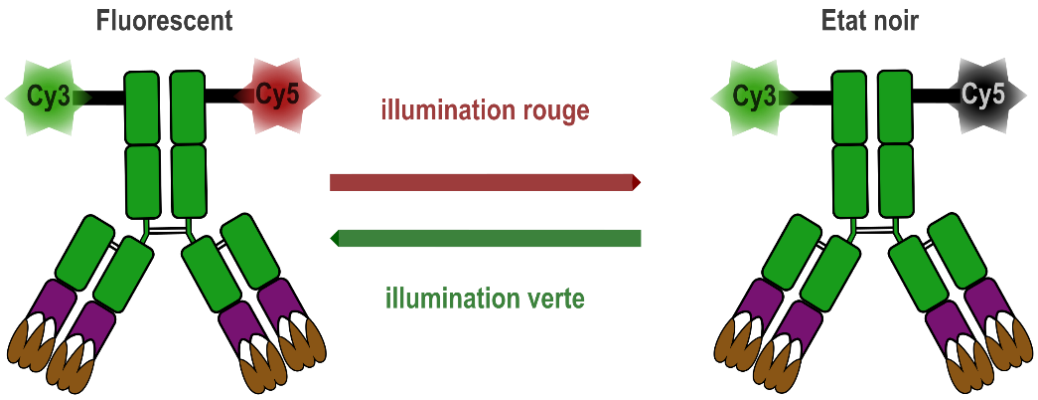


Figure 15 : Schéma du mécanisme de photoconversion du fluorophore Cy5 entre son état fluorescent ("ON") et son état éteint ("OFF") dans le cadre de la méthode STORM*. Lors d'une illumination intense à ~640 nm, Cy5 entre brièvement dans un état fluorescent avant de basculer dans un état sombre non-radiatif (OFF). L'application d'une lumière d'activation (~488 nm), en présence d'un fluorophore activateur (ex. Cy3), permet le retour stochastique d'une fraction des molécules à l'état fluorescent actif (ON). Ce cycle ON/OFF peut être répété des milliers de fois, permettant la localisation individuelle des fluorophores avec une précision nanométrique. Adapté de (Bates et al., 2013)*

Des variantes telles que dSTORM (*direct STORM*) ont ensuite été développées *(Heilemann et al., 2008)*, supprimant la nécessité d'un fluorophore activateur. Dans ce cas, des fluorophores standards, comme Alexa Fluor 647 ou CF dyes, peuvent être utilisés seuls, leur commutation reposant uniquement sur les conditions chimiques du tampon (généralement contenant du thiol et un système redox). Cette simplification du protocole a grandement facilité l'adoption de la technique, tout en conservant une résolution latérale de 20 à 30 nm.

Contrairement au clignotement induit chimiquement dans la méthode STORM, la dynamique de fluorescence dans la technique DNA-PAINT repose sur la cinétique d'interaction réversible entre des brins d'ADN complémentaires (**Figure 16**) : un brin court, fluorescent (*imager strand*), se lie transitoirement à un brin d'ancrage fixe (*docking strand*) attaché à l'anticorps secondaire d'intérêt *(Jungmann et al., 2014; Schnitzbauer et al., 2017).*

Le DNA-PAINT se distingue des autres techniques de nanoscopie par sa capacité intrinsèque au multiplexage séquentiel. Grâce à l'enchaînement de cycles de lavage et de remplacement des brins imager, il est possible d'imager successivement jusqu'à une dizaine de cibles distinctes dans un même échantillon, tout en conservant une résolution nanométrique *(Jungmann et al., 2014)*. Par ailleurs, l'apport continu en fluorophores, assuré par une forte concentration d'imager libres dans le milieu, garantit une

stabilité temporelle exceptionnelle et limite le photoblanchiment *(Schnitzbauer et al., 2017)*. Cette combinaison d'un multiplexage confère au DNA-PAINT un avantage unique pour l'imagerie quantitative multicible à l'échelle du nanomètre, sans compromis sur la précision ou la qualité du signal *(Schnitzbauer et al., 2017)*.

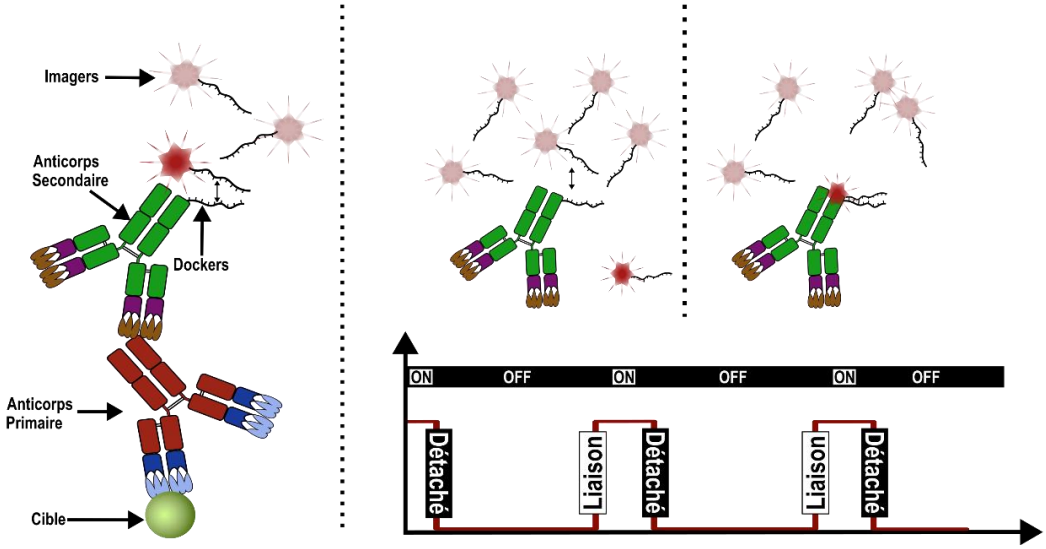


***Figure 16:* Principe du DNA-PAINT.** *Le clignotement des sondes fluorescents est induit par des liaisons transitoires et non-covalentes entre des oligonucléotides fluorescents (appelés imagers) en solution et leurs séquences complémentaires fixées sur la cible (dockers). Adapté de (Schnitzbauer et al., 2017)*

Les applications de la SMLM en contexte tissulaire se heurtent à plusieurs contraintes spécifiques. La majorité des systèmes reposent sur une illumination en réflexion totale interne (*Total Internal Reflection Fluorescence,* TIRF) *(Kwakwa et al., 2016)*. Lors de la réflexion totale interne, une onde évanescente se forme à l'interface entre deux milieux. Son intensité diminue de manière exponentielle avec la distance à l'interface, $I(z) = I_0 \cdot e^{-z/d}$ où d est la profondeur de pénétration, donnée par $d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 sin^2\theta - n_2^2}}$. Cette profondeur, typiquement de l'ordre de 100–200 nm, permet de confiner l'excitation très près de la surface de l'échantillon., restreignant fortement l'accès aux structures situées en profondeur dans les tissus biologiques. Des alternatives, telles que l'illumination oblique (*Highly Inclined and Laminated Optical sheet*, HILO), permettent d'atteindre quelques micromètres de profondeur tout en conservant un bon rapport signal/bruit *(Tokunaga et al., 2008).* Malgré ces limitations, plusieurs travaux ont démontré la faisabilité de la SMLM sur échantillons tissulaires *(Narayanasamy et al., 2021; Rames et al., 2023)*. Des adaptations du DNA-PAINT (*PRism-Illumination and Microfluidics-Enhanced DNA-PAINT,* PRIME-PAINT) ont notamment été mises en œuvre sur des coupes tissulaires en paraffine de 3 µm d'épaisseur, montées directement sur la lamelle afin de maximiser la proximité avec l'objectif et ainsi bénéficier de conditions d'illumination optimales. Cette approche a permis d'atteindre une résolution latérale de l'ordre de 30 nm *(Rames et al., 2023)*.

I.3.2.4. Stimulated Emission Depletion (STED)

La microscopie STED, introduite par Stefan Hell *(Hell and Wichmann, 1994)*, a été la première technique de super-résolution à franchir expérimentalement la limite imposée par la diffraction, en s'appuyant exclusivement sur des principes optiques. Ces travaux ont valu à Stefan Hell le prix Nobel de chimie en 2014, partagé avec Eric Betzig et William Moerner. Elle repose sur une idée clé : restreindre l'émission de fluorescence à une région de taille sub-diffractionnelle grâce à l'utilisation d'un faisceau de déplétion en forme de « donut » (**Figure 17**). Ce faisceau STED, décalé spectralement vers une longueur d'onde plus longue que celle d'excitation, induit un processus d'émission stimulée qui force les fluorophores excités en périphérie du point focal à retourner à l'état fondamental sans émission spontanée détectable. Seule la zone centrale, correspondant au minimum d'intensité du faisceau STED, échappe à cette extinction, ce qui réduit le volume effectif d'émission. En modulant l'intensité du faisceau de déplétion, il devient possible de restreindre cette zone à quelques dizaines de nanomètres, augmentant ainsi la résolution latérale bien au-delà de la limite classique de diffraction.

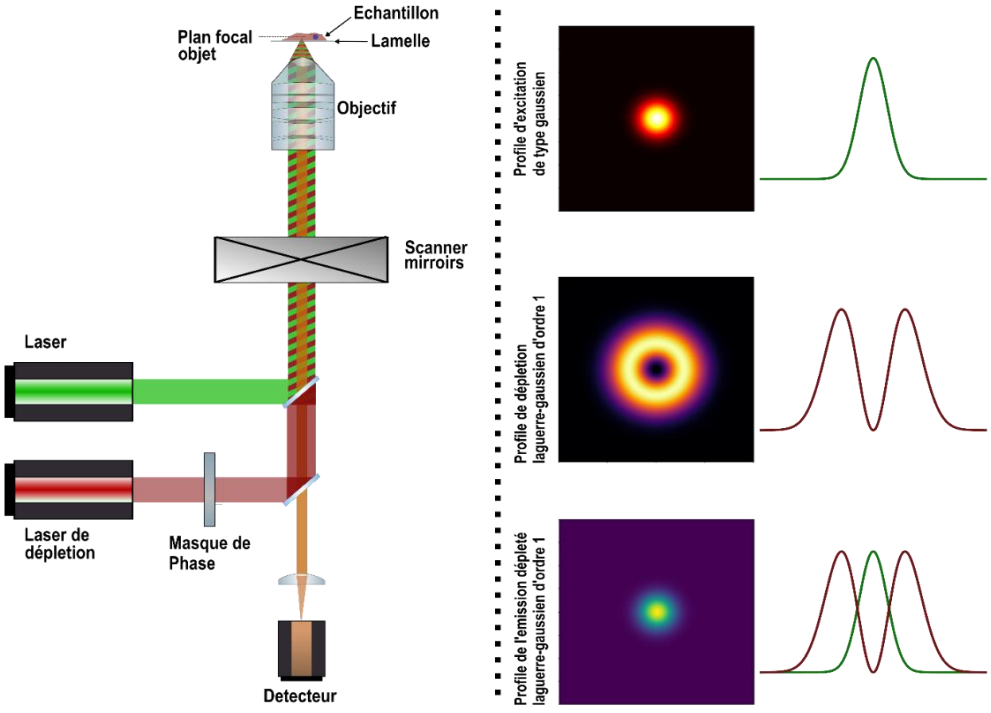


***Figure 17 : Principe fondamental du STED**. À gauche : Schéma du chemin optique d'un microscope STED, illustrant la superposition d'un faisceau d'excitation gaussien avec un faisceau de déplétion STED en forme de "donut", centrés sur le même point focal. À droite : Profil radial des deux faisceaux. Le faisceau d'excitation (en vert) excite les fluorophores dans une région, tandis que le faisceau STED (en rouge) induit une désexcitation stimulée autour du centre, ne laissant subsister la fluorescence que dans une zone centrale très restreinte.*

Concrètement, la microscopie STED met en œuvre deux faisceaux lasers appliqués de manière séquentielle :

- Un 1er faisceau d'excitation, de profil gaussien classique, qui excite uniformément les fluorophores présents dans le volume focal.
- Un 2nd faisceau de déplétion STED, en forme de « donut » toroïdal, accordé sur la longueur d'onde d'émission du fluorophore, qui induit l'émission stimulée et « éteint » la fluorescence en périphérie de la zone d'excitation

Cette approche permet de restreindre la zone d'émission effective à un volume beaucoup plus petit que celui imposé par la limite d'Abbe, atteignant 50 nm de résolution latérale, voire moins de 20 nm *(Hell and Wichmann, 1994; Liu et al., 2022)*.

Le principal atout du STED réside dans sa capacité à fournir des images super-résolues en temps réel, sans nécessiter de reconstruction algorithmique, contrairement aux approches SMLM, SIM ou ISM *(Liu et al., 2022; Schermelleh et al., 2019)*. Cependant, le choix des fluorophores compatibles reste limité, en raison des exigences spécifiques liées à la photostabilité et à la capacité de déplétion par émission stimulée. De plus, le temps d'acquisition peut devenir contraignant lorsque de grands volumes ou des échantillons fragiles doivent être explorés, et les niveaux d'illumination élevés peuvent entraîner du photoblanchiment ou des dommages photo-induits aux structures biologiques.

I.3.2.5. Intérêts des approches

L'avènement des techniques de super-résolution a profondément renouvelé les possibilités d'exploration de l'architecture tissulaire à une échelle nanométrique *(Buttafava et al., 2020; Hell and Wichmann, 1994; Lelek et al., 2021)*, auparavant inaccessible par microscopie optique conventionnelle. Chacune des approches développées présente des caractéristiques distinctes qui les rendent plus ou moins adaptées à différents types d'applications biologiques *(Schermelleh et al., 2019)*.

L'imagerie par *Image Scanning Microscopy* (ISM), notamment dans ses déclinaisons commerciales telles que AiryScan (Zeiss) ou NSPARC (Nikon Healthcare), permet d'atteindre une résolution latérale jusqu'à 120 nm *(Leisten et al., 2023)*. Reposant sur une architecture confocale, cette approche constitue un excellent compromis entre résolution spatiale, vitesse d'acquisition et simplicité de mise en œuvre. Elle se révèle particulièrement adaptée à l'étude de structures subcellulaires complexes, telles que le réseau mitochondrial ou les interactions mitochondries-lysosomes, offrant à la fois des mesures morphologiques précises et la détection des sites de contact *(Kolossov et al., 2018; Leisten et al., 2023; Mito et al., 2022)*.

L'un des principaux atouts de l'ISM réside dans sa compatibilité avec des protocoles de préparation classiques : contrairement au STED ou aux approches de SMLM, elle ne nécessite ni anticorps secondaires optimisés ni tampon spécifique. L'ISM s'impose ainsi comme une solution robuste et accessible pour la caractérisation morphologique fidèle de structures fines, aussi bien sur cellules isolées que sur coupes tissulaires.

Le microscope SIM offre une amélioration notable de la résolution, atteignant jusqu'à 100 nm, tout en conservant une compatibilité élevée avec les échantillons vivants et les fluorophores conventionnels *(Fiolka et al., 2012; Kner et al., 2009)*. À l'instar des techniques ISM, le microscope SIM permet d'atteindre une résolution suffisante pour quantifier avec précision la morphologie de structures subcellulaires. Elle offre également la possibilité d'évaluer l'intégrité membranaire des mitochondries, notamment grâce à l'utilisation du marqueur potentiel-dépendant *tetramethylrhodamine ethyl ester* (TMRE) pour l'imagerie fonctionnelle en conditions vivantes *(Gottschalk et al., 2024)*.

Initialement cantonnée aux cellules isolées, cette technique s'ouvre désormais à l'imagerie tissulaire, notamment grâce à des avancées comme le DeepSIM (CrestOptics), qui permettent d'imager jusqu'à 100 µm de profondeur. Le SIM représente ainsi une option polyvalente pour l'étude de l'organisation subcellulaire dans des contextes statique ou dynamique, aussi bien sur cellules que sur tissus. Cependant, pour bénéficier pleinement de ses avantages en termes de résolution, la méthode requiert un traitement post-acquisition spécifique, basé sur une reconstruction algorithmique des images. Ce processus peut s'avérer chronophage et sensible aux artefacts si les conditions d'acquisition ne sont pas rigoureusement contrôlées.

Les méthodes SMLM, telles que le STORM ou le DNA-PAINT, se distinguent par leur capacité à localiser des molécules individuelles avec une précision latérale de l'ordre de 10 à 30 nm. Elles permettent de cartographier avec une très haute résolution l'organisation moléculaire de structures intracellulaires complexes, comme les complexes multiprotéiques. Par exemple, l'étude de Palmer *et al.* (2021) a utilisé le STORM pour analyser l'organisation spatiale des composants du translocase mitochondrial TIM. Leur analyse basée sur des clusters de densité a révélé une distribution bimodale de TIM44, distincte de celle de TIM23, suggérant l'existence de sous-complexes fonctionnellement distincts au sein de TIM23. Par ailleurs, la protéine COXIV, composante du complexe IV, apparaît organisée en larges amas, dont la structure est altérée en cas de perturbation de l'assemblage du complexe IV. Ces résultats illustrent le potentiel des approches SMLM pour révéler des arrangements moléculaires jusque-là inaccessibles par les techniques de microscopie conventionnelles *(Palmer et al., 2021)*.

L'utilisation du dSTORM couplé à une analyse de colocalisation a permis de révéler des interactions protéiques à l'échelle sub-mitochondriale. Dans l'étude de Durel *et al.* (2021), cette approche a d'abord été utilisée pour démontrer la capacité du dSTORM à résoudre les proximités protéiques au sein des compartiments internes de la mitochondrie. Les auteurs ont ensuite montré que cette méthode

permettait de visualiser et de quantifier avec une résolution suffisante l'enzyme Aurora Kinase A (AURKA), localisée dans la matrice mitochondriale *(Durel et al., 2021)*.

Une étude utilisant la microscopie STORM sur des neurones primaires de souris a permis de comparer la distribution spatiale de deux protéines clés des mitochondries : l'*uncoupling protein* 4 (UCP4) et l'ATP synthase (F0F1). Les résultats ont révélé une ségrégation topologique marquée : UCP4 est localisée principalement dans la membrane mitochondriale interne (IMM) à proximité du *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC), tandis que l'ATP synthase est majoritairement localisée au niveau des crêtes mitochondriales. Cette organisation spatiale suggère que l'UCP4 ne peut pas entrer en compétition directe avec les pompes à protons ni avec l'ATP synthase, en raison de sa séparation physique au sein de l'architecture mitochondriale. Ces observations renforcent l'hypothèse d'une compartimentation fonctionnelle au sein de la mitochondrie pour optimiser le couplage entre transport de protons et synthèse d'ATP *(Klotzsch et al., 2015).*

L'approche DNA-PAINT suscite un intérêt croissant pour les applications en contexte tissulaire *(Narayanasamy et al., 2021; Rames et al., 2023)* en raison de sa capacité de multiplexage élevée permettant la détection simultanée de près d'une dizaine de cibles distinctes *(Schnitzbauer et al., 2017)*. *Narayanasamy et al., (2021)* ont démontré qu'il est possible d'atteindre une résolution latérale de l'ordre de 25 nm sur des coupes ultra-fines de tissu nerveux (350 à 400 nm d'épaisseur). Une autre étude basée sur l'adaptation de l'approche DNA-PAINT à des coupes paraffine de 3 µm d'épaisseur, en utilisant un système d'illumination à angle variable, capable de passer de l'épi-fluorescence au mode *Total Internal Reflexion* (TIR) strict en ajustant latéralement l'incidence du faisceau laser. Cette flexibilité optique optimise l'excitation des fluorophores à proximité de la surface tout en limitant le bruit de fond, améliorant ainsi la qualité de l'image dans des tissus fixés *(Rames et al., 2023)*.

Enfin, le STED permet de franchir de manière continue la barrière des 50 nm de résolution, sans nécessiter de traitement post-acquisition. L'utilisation du STED avec un marqueur ciblant la matrice mitochondriale interne a permis de quantifier la fréquence de répétition des crêtes mitochondriales *(Ren et al., 2024)* et de cartographier avec précision la distribution de l'ADN mitochondrial dans la matrice, en lien avec l'architecture des crêtes.

Tableau 1 : Comparaison de techniques de super-résolution

Technique	Résolution (XY)	Profondeur imagerie	Vitesse	Compatibilité tissu	Préparation échantillon	Multiplexing	Applications
ISM (AiryScan, NSPARC)	~120 nm	~50 µm (confocale)	Rapide	Très bonne	Standard (anticorps ou marqueurs usuels)	Modérée (~3-4 canaux)	Morphologie subcellulaire, dynamique mitochondriale
SIM	~100 nm	Jusqu'à 100 µm (DeepSIM)	Rapide à modérée	Bonne	Standard	Modérée à élevée	Cellules vivantes, structures subcellulaires
SMLM	10–30 nm	Très faible (~100 nm en TIRF)	Lente (minutes à heures)	Faible à modérée	Spécifique (tampons réducteurs, anticorps modifiés)	Très élevée (DNA-PAINT)	Cartographie moléculaire, interactions protéine-protéine
STED	~30–50 nm	Faible à modérée	Rapide	Modérée	Fluorophores spécifiques, anticorps secondaires optimisés	Faible à modérée	Détails fins sur cellules fixes, topologie de membranes

I.3.3. Microscope à feuille de lumière

La microscopie à feuille de lumière (LSFM) repose sur un principe d'illumination différent de celui des approches confocales ou multiphotoniques. Dans cette configuration optique, les axes d'illumination et de détection sont perpendiculaires l'un à l'autre. L'échantillon est éclairé latéralement par une fine lame de lumière, généralement générée à partir d'un faisceau gaussien focalisé dans un plan unique à l'aide d'une lentille cylindrique. Seule cette tranche optique est excitée, réduisant l'illumination hors foyer. L'image résultante est recueillie à 90° par un objectif de détection, qui enregistre exclusivement le signal fluorescent issu du plan éclairé *(Voie and Spelman, 1995; Adams et al., 2015)* (**Figure 18**).

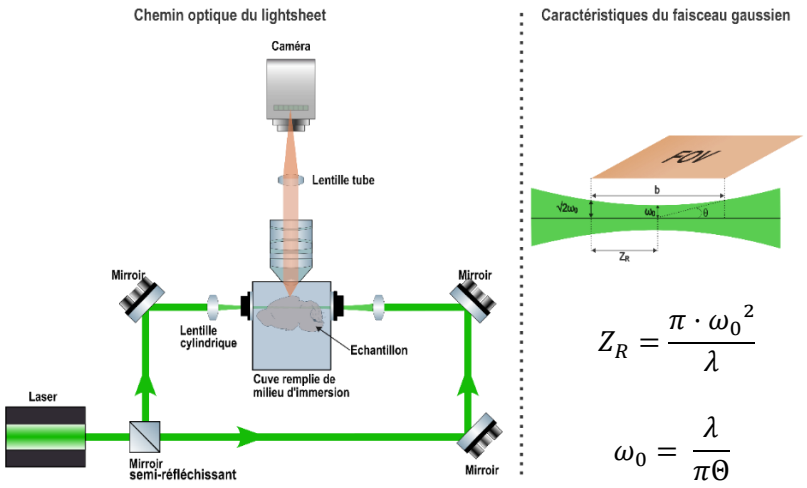


*Figure 18 : **Chemin optique d'un microscope à feuille de lumière (lightsheet).** À gauche : schéma du principe optique d'un système lightsheet, où l'échantillon est éclairé latéralement par une fine lame de lumière (feuille) perpendiculaire à l'axe de détection. À droite : représentation des caractéristiques d'un faisceau gaussien, illustrant la zone de Rayleigh (zone optimale d'illumination avec faible divergence, Z_R) et le waist (ω_0), qui correspond à l'épaisseur minimale de la feuille de lumière et définit la résolution axiale du système. Le champ de vue optimal (FOV) est centré sur cette zone de Rayleigh, assurant une excitation homogène et localisée. Adapté de (Adams et al., 2015; Huisken et al., 2004)*

La capacité de la LSFM à imager des échantillons volumineux allant d'un organe entier *(Renier et al., 2014)* jusqu'à une souris complète *(Susaki et al., 2015)* dans certains systèmes permet d'obtenir une cartographie 3D exhaustive de la structure étudiée *(Renier et al., 2016)*. Cette approche ouvre la voie à une analyse globale de l'architecture tissulaire ou de la distribution cellulaire à l'échelle de l'organe, tout en conservant une résolution suffisante pour identifier des structures dans des contextes biologiques complexes.

Plusieurs variantes de la microscopie à feuille de lumière ont émergé au fil des dernières décennies afin de répondre aux exigences spécifiques de différents types d'échantillons et de résolutions. La version historique et la plus largement utilisée est la *Selective Plane Illumination Microscopy* (SPIM) *(Huisken et al., 2004)*, qui constitue la base des systèmes à feuille de lumière modernes. Cette configuration est particulièrement adaptée à l'imagerie d'organismes modèles vivants, comme l'embryon de poisson-zèbre *(Huisken et al., 2004; Weber and Huisken, 2011)* ou de drosophile *(Memeo et al., 2021)*, pour lesquels elle permet un suivi dynamique du développement avec un compromis entre résolution, vitesse et phototoxicité minimale.

Pour améliorer la couverture spatiale et la symétrie de l'imagerie en feuille de lumière, la configuration diSPIM (*dual-view inverted SPIM*) a été introduite *(Wu et al., 2013)*. Ce système repose sur deux objectifs disposés en vis-à-vis, chacun étant capable d'illuminer et de détecter alternativement, en jouant successivement le rôle d'émetteur et de collecteur de fluorescence *(Kumar et al., 2014; Wu et al., 2013)*. Cette stratégie de double acquisition permet une reconstruction plus isotrope du volume imagé, en corrigeant les artefacts directionnels (liés à l'ombrage ou à une illumination unilatérale) et en réduisant les zones non résolues *(Kumar et al., 2014; Wu et al., 2013)*. La combinaison des deux vues obtenues selon des axes perpendiculaires permet une fusion d'images par algorithmes de déconvolution, offrant ainsi une résolution plus homogène dans toutes les dimensions. Ce type de configuration est particulièrement utile pour l'imagerie d'échantillons tridimensionnels denses et complexes, tels que les organoïdes, les embryons ou les tissus épais, dans lesquels une simple illumination latérale serait insuffisante pour atteindre l'ensemble des structures internes *(Keller and Ahrens, 2015)*.

Pour l'imagerie à grande échelle, des systèmes tels que le mesoSPIM ou l'Ultramicroscope ont été spécifiquement développés pour l'observation d'échantillons de taille centimétrique, tels que des cerveaux de souris, des organes entiers ou des embryons complets transparisés *(Voigt et al., 2019)*. Ces plateformes sont optimisées pour l'analyse de tissus clarifiés à l'aide de protocoles comme CLARITY, CUBIC ou iDISCO, qui éliminent les lipides et homogénéisent l'indice de réfraction afin de limiter la diffusion optique *(Kirschenbaum et al., 2023; Susaki et al., 2015; Voigt et al., 2019)*. Grâce à une feuille de lumière élargie et à des objectifs à grand champ, ces dispositifs permettent une visualisation tridimensionnelle complète de réseaux biologiques complexes dans leur architecture native. Ils associent

une profondeur de champ étendue, une résolution volumique homogène sur de larges volumes, et une vitesse d'acquisition élevée.

Enfin, une autre avancée majeure pour améliorer la résolution est représentée par le microscope *lattice light sheet* *(Chen et al., 2014)*. Développée par Eric Betzig, elle repose sur la création d'une feuille de lumière structurée, constituée d'un motif d'interférences lumineux (lattice), généré par un réseau de faisceaux Bessel *(Chen et al., 2014)*. Ce motif permet de confiner l'excitation à un plan fin tout en maintenant un bon rapport signal/bruit *(Qiao et al., 2025).* Cette technique permet d'atteindre des résolutions subcellulaires avec un minimum de photodommages, et ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude dynamique des processus intracellulaires sur des périodes prolongées, y compris dans des cellules vivantes *(Chen et al., 2014; Liu et al., 2023; Qiao et al., 2025)*.

I.4. Imagerie multiphotonique multimodale

L'imagerie multiphotonique regroupe, au sein d'un même système optique, plusieurs modalités exploitant des contrastes optiques non linéaires complémentaires, permettant une exploration simultanée et corrélée des propriétés structurales et fonctionnelles des tissus biologiques. Les configurations les plus courantes associent la fluorescence multiphotonique, sensible à la distribution spatiale de fluorophores endogènes ou exogènes, et la génération harmonique (SHG et THG), qui met en évidence sans marquage les structures non centrosymétriques ou présentant de fortes discontinuités d'indice de réfraction. Cette combinaison permet, en une seule acquisition, d'obtenir des informations moléculaires, morphologiques et organisationnelles, optimisant ainsi la corrélation entre données fonctionnelles et architecture tissulaire.

I.4.1. Source lasers

L'absorption biphotonique est un phénomène non linéaire de faible probabilité, qui ne se produit que lorsque deux photons de faible énergie (dans l'infrarouge) sont absorbés quasi simultanément par une même molécule fluorescente Ce processus est spatialement et temporellement confiné à une très petite région autour du point focal, là où la densité de photons est suffisante *(Rubart, 2004).* Cette contrainte naturelle confère à la microscopie biphotonique un sectionnement optique intrinsèque, sans recours à un diaphragme confocal (pinhole) *(Rubart, 2004)*. Il en résulte une réduction significative de la phototoxicité et du photoblanchiment en dehors du plan focal, ce qui constitue un atout majeur pour l'imagerie en profondeur dans les tissus, en particulier en conditions in vivo ou ex vivo *(Centonze and White, 1998; Lacin and Yildirim, 2024; Tandon et al., 2021)*.

La microscopie multiphotonique repose principalement sur l'utilisation de lasers femtoseconde pulsés dans l'infrarouge, en particulier les lasers Ti:Sapphire accordables, couvrant une gamme spectrale typique de 680 à 1000 nm. Ces sources délivrent des impulsions ultra-courtes (de 80 à 200 femtosecondes), avec une fréquence de répétition élevée (80 à 100 MHz), permettant une concentration temporelle de photons suffisante pour induire l'absorption biphotonique tout en limitant l'échauffement

tissulaire. Leur flexibilité spectrale les rend compatibles avec une grande variété de fluorophores classiques, et leur efficacité pour l'excitation multiphotonique profonde assure un bon compromis entre résolution, contraste et pénétration optique *(Denk et al., 1990; Williams et al., 2005)*.

D'autres sources laser ont été développées pour étendre les capacités de l'imagerie 2P, notamment en profondeur :

- Les lasers à fibre dopée à l'ytterbium (Yb), émettant entre 1030 et 1080 nm, sont particulièrement prisés pour leur faible diffusion dans les tissus, leur stabilité de puissance, et leur rendement énergétique élevé, ce qui les rend adaptés à l'imagerie des tissus épais ou opaques *(Horton et al., 2013)*.
- Les lasers Cr:Forstérite, centrés autour de 1250 nm, sont utilisés pour l'imagerie de milieux fortement diffusants, comme les végétaux ou certains tissus animaux profonds *(Chu et al., 2001; Liu et al., 2001)*.
- Les oscillateurs optiques paramétriques (OPO, *Optical Parametric Oscillators*), dérivés d'un laser maître Ti:Sapphire, permettent une plage spectrale élargie de 1000 à 1600 nm (voire au-delà). Ces systèmes accordables sont aujourd'hui très répandus pour exciter des fluorophores dans le rouge lointain, pour imager des structures endogènes, ou pour améliorer l'imagerie label-free par SHG ou THG *(Genthial et al., 2017; Olivier et al., 2010)*

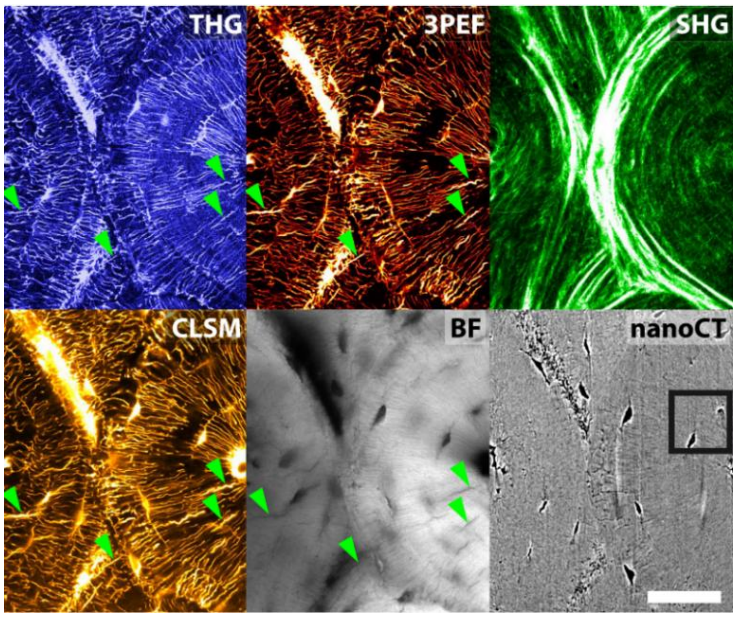


Figure 19 : ***Imagerie multimodale d'un tissu osseux. Représentation de plusieurs modalités d'imagerie pour l'analyse fine de l'os cortical****. L'imagerie THG révèle la porosité intracorticale, incluant les lacunes ostéocytaires et les canalicules. Le signal 3PEF (Three-Photon Excited Fluorescence) permet la détection d'éléments fluorescents endogènes ou exogènes. Le contraste SHG (Second Harmonic Generation) met en évidence l'organisation fibrillaire du collagène. Les images CLSM (microscopie confocale à balayage laser), BF (brightfield), et nanoCT (nano-computed tomography) apportent des informations complémentaires sur la structure pour valider les observations. D'après Genthial et al., 2017*

I.4.2. Mode de détection : réflexion (backward) ou transmission (forward)

En microscopie multiphotonique, le choix du mode de détection en réflexion (*backward*, ou epi-détection) ou en transmission (*forward*) a un impact sur la qualité et la localisation du signal collecté.

Dans le cas de la fluorescence multiphotonique (2PEF, 3PEF), l'émission est incohérente et isotrope, ce qui signifie qu'elle est émise dans toutes les directions à partir du foyer d'excitation. Elle peut donc être détectée efficacement en *backward* ou *forward*, en fonction de la configuration optique et de l'opacité de l'échantillon. L'epi-détection (*backward*) est la plus couramment utilisée, car elle permet de recueillir le signal du même côté que l'objectif d'excitation, ce qui est particulièrement adapté à l'imagerie de tissus opaques, in vivo ou en conditions biologiques standards.

En revanche, pour les signaux cohérents et directionnels générés par la SHG ou la THG, la direction de propagation dépend fortement des propriétés optiques de l'échantillon, notamment des discontinuités d'indice de réfraction et de la longueur de cohérence (*coherence length*, LC). La LC est typiquement de l'ordre de 10 µm en transmission (*forward*), mais seulement ~80 nm en réflexion (*backward*) pour les signaux harmoniques *(Pavone and Campagnola, 2014)*. Ainsi, le signal SHG est principalement émis en *forward* dans les tissus épais, du fait de sa nature cohérente et de la LC plus longue, permettant une addition constructive du signal dans la direction de propagation. Toutefois, une composante *backward* peut être observée dans des structures fines.

En ce qui concerne la THG, le signal est généralement plus intense en *forward*, en raison des mismatchs d'indice plus marqués dans cette direction, à l'interface entre deux milieux optiquement hétérogènes. Cependant, lorsque l'échantillon est très diffusant ou opaque, comme c'est souvent le cas en imagerie *in vivo*, la détection en *backward* (épi-détection) devient nécessaire, malgré une perte d'efficacité de collecte.

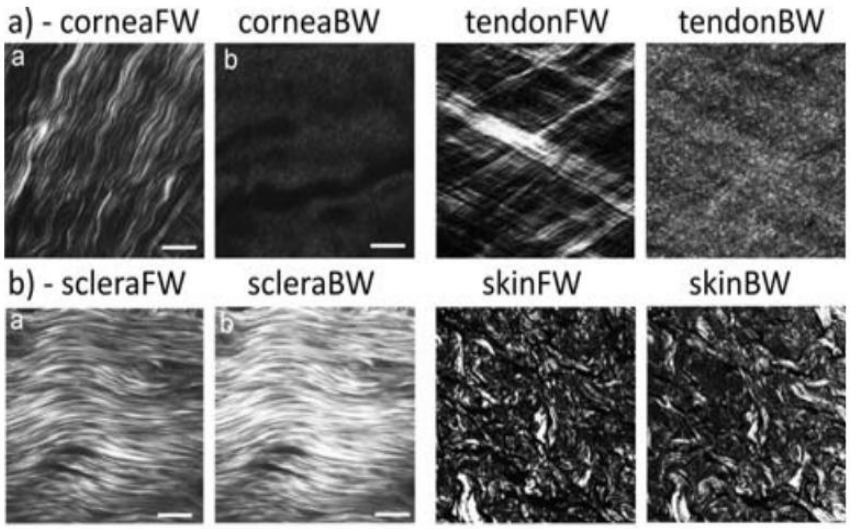


***Figure 20**: **Comparaison du signal SHG en mode forward et backward sur divers tissus**. Imagerie en génération de seconde harmonique (SHG) sur des coupes fines de cornée, sclérotique, tendon et peau humaine. Le signal détecté en transmission (forward) est globalement plus intense que celui détecté en réflexion (backward), ce qui reflète la nature cohérente et directionnelle de l'émission SHG. Toutefois, certains tissus comme la peau ou la sclérotique présentent un signal backward significatif, attribuable à leur structure dense, leur fort désordre optique local, ou à des interfaces fibreuses compactes. D'après Cicchi et al., 2013*

I.4.3. Polarisation

La polarisation de la lumière incidente joue un rôle essentiel en microscopie non linéaire, en particulier pour les signaux cohérents comme la SHG et la THG, qui dépendent fortement de l'orientation moléculaire et cristalline des structures observées *(Morizet et al., 2025; Rouède et al., 2013, 2011)*. Le contrôle de la polarisation permet ainsi d'optimiser le contraste, de sonder l'anisotropie des tissus, voire d'extraire des informations structurales fines sur l'orientation des fibres, membranes ou macromolécules.

I.4.3.1. Polarisation linéaire

Dans une polarisation linéaire, le vecteur électrique de l'onde lumineuse oscille dans une seule direction. Cette configuration est particulièrement utilisée pour sonder l'anisotropie d'orientation des structures, comme les fibres de collagène ou la myosine en SHG. En effet, le signal SHG est maximal lorsque la polarisation du faisceau d'excitation est alignée avec l'hyperpolarisabilité intrinsèque de la moléculaire. Ainsi, en faisant varier l'angle de polarisation incidente, à l'aide d'une lame demi-onde, on peut mesurer des profils de réponse angulaire permettant de cartographier l'orientation des structures fibrillaires *(Fuentes-Corona et al., 2019; Odin et al., 2008; Rouède et al., 2017; Schürmann et al., 2010)*.

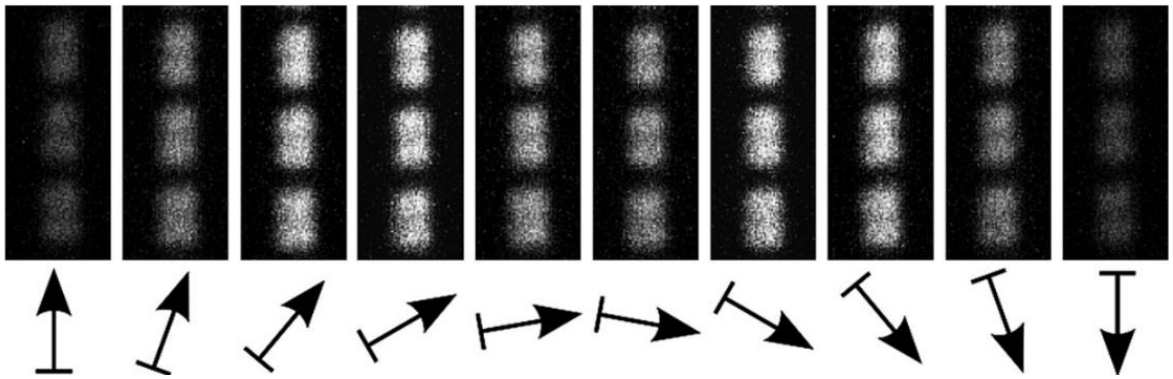


Figure 21 : ***Profil d'orientation du signal SHG dans les myofibrilles****. Variation de l'intensité du signal SHG en fonction de l'angle d'incidence de la polarisation incidente, mettant en évidence l'anisotropie structurale des myofibrilles. Ce profil angulaire reflète l'organisation ordonnée des filaments de myosine, responsables du signal SHG. D'après (Schürmann et al., 2010)*

I.4.3.2. Polarisation circulaire

La polarisation circulaire (gauche ou droite) correspond à une rotation continue du vecteur électrique autour de l'axe de propagation. Elle est moins sensible à l'orientation des structures que la polarisation linéaire, mais permet une illumination isotrope, ce qui peut être utile pour réduire les biais directionnels dans les échantillons désorganisés *(Altendorf et al., 2012; DeWalt et al., 2014)*. Elle est parfois préférée dans les expériences où une uniformité d'excitation est requise ou dans des contextes d'imagerie en profondeur, où la polarisation linéaire peut être altérée par la biréfringence tissulaire *(Pena et al., 2005)*.

I.4.4. Intérêt de la microscopie multiphotonique pour l'imagerie 3D

La microscopie multiphotonique constitue une approche particulièrement puissante pour l'imagerie tridimensionnelle en profondeur dans les tissus biologiques. L'utilisation de lasers dans l'infrarouge réduit significativement la diffusion et l'absorption de la lumière par les composants tissulaires, optimisant ainsi la transmission dans les milieux opaque. Cette fenêtre spectrale minimise également la phototoxicité et le photoblanchiment en dehors du volume focal, ce qui permet l'acquisition d'images sur de longues durées.

Grâce à ses propriétés, la microscopie multiphotonique permet d'atteindre des profondeurs d'imagerie pouvant approcher, voire dépasser, 1 mm dans certains tissus peu absorbants et faiblement diffusants, tels que le cortex cérébral, en conditions *in vivo* *(Horton et al., 2013)*. Par ailleurs, elle offre des capacités uniques d'imagerie sans marquage grâce à la SHG, notamment pour la caractérisation 3D du collagène, composant majeur de la matrice extracellulaire (MEC). Dans un contexte pathologique, Weigelin et al. (2012) ont démontré la pertinence de l'imagerie multiphotonique pour le suivi *in vivo* 3D de l'invasion tumorale, du remodelage secondaire des tissus et du conditionnement du microenvironnement par des microparticules, atteignant une profondeur d'imagerie allant jusqu'à 600 µm dans un modèle murin.*(Weigelin et al., 2012)* .

D'autres travaux ont mis en évidence l'intérêt de la SHG pour étudier la capacité de cellules de type myofibroblastique à remodeler des matrices 3D. Cette technique permet de visualiser, de manière non invasive et sans marquage, la structure et la topologie du collagène, offrant ainsi un suivi direct des modifications architecturales induites par l'activité cellulaire au sein de la MEC *(Robinson et al., 2016)*. De plus, associée à l'utilisation d'une lame demi-onde permettant de moduler la polarisation de l'onde incidente, la SHG offre la possibilité de sonder finement l'organisation fibrillaire. Cette approche a été mise en évidence par *Odin et al.,(2008)*, sur des tissus tendineux, par *James et al., (2021)* sur des sphéroïdes 3D, ou encore par *Altendorf et al., (2012)* sur des fibres de collagène en utilisant une polarisation circulaire. Dans un contexte pathologique, l'exploration de la SHG appliquée aux bandes de myosine a permis de quantifier le désalignement des myofibrilles, révélant ainsi des altérations structurales caractéristiques du muscle atteint de dystrophie de Duchenne ou de maladie de Pompe *(Rouède et al., 2017; Liu et al., 2013)*

De plus, la THG constitue une modalité de contraste complémentaire particulièrement intéressante pour la caractérisation des structures biologiques. Cette technique permet de révéler, sans marquage, les interfaces optiques ainsi que les hétérogénéités d'indice de réfraction présentes au sein des tissus. Rehberg et al. (2011) ont notamment mis en évidence le potentiel de la THG pour l'observation tridimensionnelle de diverses structures, telles que les fibres musculaires (notamment les bandes I interjacentes) ainsi que les leucocytes, soulignant ainsi la pertinence de cette modalité pour l'imagerie tissulaire à haute résolution *(Rehberg et al., 2011)*.

Tableau 2 : Comparaison de système d'imagerie en profondeur

Technique	Avantages	Limitations	Example d'applications	Références
Multiphoton	Sectionnement optique intrinsèque, faible phototoxicité, pénétration (~200 µm selon la nature du tissu). Contraste supplémentaire (SHG, THG, Autofluo NADH, FAD)	Acquisition lente, résolution limitée par la diffraction	Imagerie *in vivo*, tissus épais, métabolisme NADH/FAD, imagerie collagène avec la SHG, imagerie myéline avec la THG	*(Blacker and Duchen, 2016; Strupler et al., 2007; Hajjar et al., 2018; Centonze and White, 1998)*
mesoSPIM / Ultramicroscope	Très faible phototoxicité, imagerie rapide, adaptée aux grands volumes	Nécessite, résolution inférieure à celle des techniques classiques, Image lourd (>1 To)	Cerveau de souris, embryons, cartographie de réseaux biologiques	*(Almagro et al., 2021; Kirschenbaum et al., 2023; Voigt et al., 2019)*
diSPIM	Imagerie isotrope, réduction des ombres et artefacts directionnels	Alignement complexe, image plus lourd	Organismes 3D, développement, morphogenèse, imagerie 4D	*(Kumar et al., 2014; Wu et al., 2013)*
Lattice Light Sheet	Résolution subcellulaire, très faible photodommage	Instrumentation complexe, coût élevé, non-adapté aux tissu épais	Imagerie 4D dynamique subcellulaire et très résolue (~280 nm)	*(Chen et al., 2014; Qiao et al., 2025)*

I.4.5. Limite des systèmes d'imagerie classiques pour l'imagerie 3D

Malgré ses nombreux avantages en termes de sectionnement optique, de profondeur de pénétration et de diversité des contrastes, la microscopie multiphotonique reste relativement lente pour l'imagerie de grands volumes, en raison de son acquisition point par point et du temps nécessaire à la reconstruction 3D *(Xu et al., 2024)*. De plus, l'irradiation répétée, même confinée au foyer, peut induire une phototoxicité significative lors d'imageries prolongées sur des échantillons volumineux *(Débarre et al., 2014)*. Outre les limites intrinsèques imposées par la diffraction, d'autres phénomènes optiques altèrent également la qualité des images obtenues, notamment lors de l'imagerie en profondeur. Ces limitations sont en grande partie dues à l'hétérogénéité optique des tissus biologiques. Celle-ci engendre des phénomènes de diffusion et d'absorption à l'échelle microscopique, qui affectent la propagation des ondes lumineuses. En conséquence, la profondeur d'imagerie utile est généralement limitée selon le tissu. Elle est d'environ 150-200 µm pour la peau *(Yew et al., 2014)*, 1500 µm dans le cerveau *(Miller et al., 2017)* et 150 µm pour le muscle *(Schneidereit et al., 2021)*.

À ces contraintes peuvent s'ajouter des aberrations optiques. Parmi elles, l'aberration chromatique qui est causée par la dispersion de la lumière dans les éléments optiques (*Blanc et al., 2023)* : les différentes longueurs d'onde n'ont pas le même indice de réfraction, ce qui entraîne une focalisation décalée selon la longueur d'onde. Les aberrations sphériques, quant à elles, résultent d'un défaut de focalisation des rayons incidents selon leur distance à l'axe optique. Elles déforment le front d'onde et élargissent le point de focalisation, entraînant une baisse de résolution latérale et axiale *(Tanabe et al.,*

2015). Ces aberrations sont amplifiées lors de l'imagerie profonde, notamment en présence de milieux à indices non homogènes *(Blanc et al., 2023; Tanabe et al., 2015)*.

Pour surmonter ces obstacles, des techniques de traitement de l'échantillon, tel que la transparisation sont développées afin de limiter les phénomènes d'absorption et de diffusion et ainsi améliorer l'imagerie 3D. D'autres, intègrent des corrections optiques avancées (optiques adaptatives, post-traitement algorithmique) qui permettent de compenser en grande partie ces distorsions.

I.5. Amélioration de l'imagerie en profondeur par la transparisation des tissus



***Figure 22**: Werner Spalteholz.*

L'histoire de la transparisation remonte au début du XXe siècle, avec les travaux pionniers de Werner Spalteholz *(Richardson and Lichtman, 2015)*. Dès 1911, ce médecin allemand mis au point une méthode permettant de rendre des organes biologiques transparents à l'aide d'un mélange de salicylate de méthyle et de benzoate de benzyle, deux solvants hydrophobes ayant des indices de réfraction proches de celui des tissus. Cette technique, désormais connue sous le nom de méthode de Spalteholz, constitue la 1re approche de clarification à base de solvants organiques.

Depuis ces travaux initiaux, les techniques de transparisation ont connu un développement remarquable, en particulier au cours des deux dernières décennies, en réponse aux besoins croissants de l'imagerie 3D des tissus biologiques *(Costantini et al., 2019; Richardson and Lichtman, 2015; Silvestri et al., 2016)*. Aujourd'hui, ces méthodes se répartissent en plusieurs grandes familles, selon le principe chimique utilisé pour homogénéiser l'indice de réfraction des échantillons *(Richardson and Lichtman, 2015; Silvestri et al., 2016)*.

Les méthodes à base de solvants organiques (ou hydrophobes) reposent généralement sur un protocole en deux étapes *(Renier et al., 2014)* : une déshydratation progressive, souvent à l'aide de séries croissantes de solvants, suivie d'une étape de dissolution des lipides et d'immersion dans un milieu de clarification à haut indice de réfraction. Parmi les protocoles les plus utilisés, on retrouve BABB (*Benzyl Alcohol Benzyl Benzoate*) et iDISCO+, qui offrent une transparisation efficace, même dans des tissus denses ou adultes *(Costantini et al., 2019; Richardson and Lichtman, 2015)*. Toutefois, ces méthodes présentent plusieurs inconvénients, dont le rétrécissement important des échantillons (jusqu'à 40 % de réduction de volume), la perte potentielle de fluorescence endogène, ainsi qu'une toxicité élevée des solvants, rendant leur manipulation délicate *(Richardson and Lichtman, 2015)*.

Les méthodes à base aqueuse (ou hydrophiles) utilisent des solutions contenant des agents tels que le fructose, l'urée, ou des détergents doux, pour rendre les tissus transparents tout en maintenant leur hydratation *(Susaki et al., 2015; Tainaka et al., 2018, 2016)*. Ces approches, comme CUBIC, Scale ou

SeeDB, sont plus compatibles avec la fluorescence endogène et induisent peu de modifications morphologiques, bien qu'elles soient parfois moins efficaces sur des échantillons très denses.

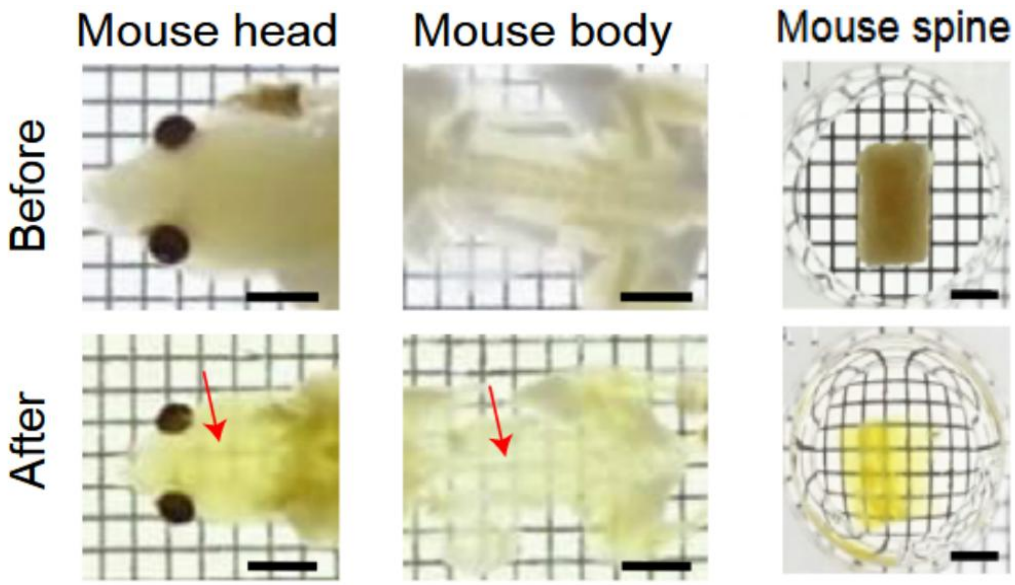


Figure 23 : Illustration d'échantillon avant et après transparisation*. Photographies comparatives d'un tissu biologique avant (1re ligne) et après (2e ligne) application de la méthode CUBIC. La clarification optique permet de rendre l'échantillon macroscopiquement transparent, en homogénéisant les indices de réfraction. (Tainaka et al., 2018)*

Les méthodes à base de polymères ou de gels, telles que CLARITY, reposent sur l'incorporation de l'échantillon dans un gel polymérisé qui stabilise les protéines tout en permettant l'extraction active des lipides (par diffusion ou électrophorèse). Ces techniques sont particulièrement adaptées à l'imagerie moléculaire et à la préservation de la structure tissulaire, au prix de protocoles plus complexes et plus longs *(Lagerweij et al., 2017; Tomer et al., 2014)*.

Tableau 3 : *comparaison de différentes techniques de transparisation. Adapté de (Richardson and Lichtman, 2015; Seo et al., 2016)*

Technique	Indice final (RI)	Réactif principal	Efficacité	Temps pour transparaiser	IHC	Échelle	PF[1]	Intégrité tissu	Toxicité	Références
BABB	~1,56	Benzyl Alcohol + Benzyl Benzoate	Forte	2–4 jours	Oui	Souris adulte	Non	Non	Elevée	*Dodt et al., 2007*
iDISCO+	~1,56	DBE (Dibenzyl éther), méthanol, DCM	Très forte	5–7 jours	Oui	Cerveau de souris adulte	Non	Rétrécissement	Elevée	*Renier et al., 2014*
CUBIC	1,47 – 1,49	Urea, Triton X-100, sucrose	Très forte	3–10 jours	Oui	Cerveau souris jeune / Souris adulte (CUBIC perfusion)	Bonne	Expansion	Modérée	*Susaki et al., 2015*
SeeDB	~1,49	Fructose saturé	Faible	2–3 jours	Non	Cerveau jeune souris	Très bonne		Faible	*Ke et al., 2013*
Scale	1,38 – 1,45	Urée, Triton X-100, glycérol	Modéré	7–14 jours	Non	Cerveau de souris adulte	Bonne	Pas de changement	Faible	*Hama et al., 2011*
CLARITY	~1,45	Hydrogel acrylamide + SDS	Très forte	7–14 jours (ou plus)	Oui	Cerveau de souris adulte	Excellent	Expansion	Modérée à élevée	*Chung et al., 2013*
PEGASOS	~1,56	Quadrol, tert-butanol, BB	Très forte	7–10 jours	Oui	Souris adulte	Bonne	Non	Elevée	*Jing et al., 2018*

Chacune de ces approches de transparisation présente des compromis spécifiques, que ce soit en termes de rapidité d'exécution, de compatibilité avec les marqueurs fluorescents, de préservation de la morphologie tissulaire ou encore de profondeur d'imagerie atteignable. Le choix de la méthode la plus adaptée dépend ainsi étroitement du type de tissu étudié et de la stratégie de marquage employée (anticorps, transgènes, colorants), qu'il s'agisse d'une cartographie cellulaire, d'une étude morphométrique ou fonctionnelle (voir synthèse **Tableau 3**).

L'imagerie d'échantillons clarifiés et volumineux requiert souvent des systèmes d'acquisition à la fois rapides, sensibles et peu phototoxiques. La microscopie à feuille de lumière s'est imposée comme une modalité particulièrement adaptée à ces exigences. La LSFM permet ainsi de capturer rapidement des images 3D à haute résolution, et même d'effectuer de l'imagerie 4D (temps + volume) chez des organismes vivants ou dans des tissus entiers clarifiés, en préservant au mieux leur intégrité structurelle.

[1] Compatibilité des techniques avec les protéines fluorescentes (PF)

En complément, l'imagerie de tissus transparisés par microscopie multiphotonique présente un intérêt particulier. L'acquisition de signaux non linéaires, tels que la SHG, fournit une information structurelle supplémentaire, comme cela a été démontré au sein de l'équipe *(Pichon et al., 2022)*. Associée aux méthodes de transparisation, cette approche permet d'atteindre des profondeurs d'imagerie supérieures à 1 mm, et pouvant aller jusqu'à 2 mm, tout en conservant une homogénéité du signal en profondeur, comme illustré dans le cerveau de souris transparisé avec la méthode CLARITY *(Lagerweij et al., 2017)*

Si chaque technique d'imagerie permet individuellement une exploration volumique, super-résolue ou offre parfois une modalité de contraste spécifique, telle que la SHG ou la THG pour l'étude des tissus, leur véritable potentiel se révèle lorsqu'elles sont intégrées dans des approches de continuum spatial appliquées au même échantillon. L'objectif de ces approches est de combiner plusieurs modalités d'imagerie afin d'exploiter simultanément les observations réalisées à différentes échelles spatiales et informatives.

I.6. Microscopie corrélative

La microscopie corrélative repose sur la combinaison de différentes modalités d'imagerie, permettant d'accéder à des informations complémentaires qu'une seule technique ne pourrait fournir à elle seule. L'un des exemples les plus courants est l'association de la microscopie électronique et de la microscopie à fluorescence, qui tire parti des avantages respectifs de chaque approche : d'un côté, la résolution nanométrique et le niveau de détail offerts par l'imagerie ultrastructurale, de l'autre, la capacité à localiser spécifiquement des molécules ou à visualiser des interactions dans leur contexte cellulaire ou tissulaire.

La 1re approche de microscopie corrélative combinant fluorescence et microscopie électronique remonte à 1976, avec les travaux de *C. Bucana et al., (1976)*. L'objectif de cette étude était d'investiguer le mécanisme de cytotoxicité médiée par les macrophages sur des cellules tumorales in vitro. Les données morphologiques ont été obtenues par une combinaison séquentielle de time-lapse, d'immunofluorescence, de microscopie électronique à balayage (SEM) et de microscopie électronique à transmission (TEM) sur des interactions individuelles entre macrophages et cellules tumorales. Cette étude pionnière illustre parfaitement l'intérêt de combiner différentes modalités d'imagerie pour accéder à des informations complémentaires, inaccessibles par l'une ou l'autre méthode seule *(Bucana et al., 1976)*.

Depuis cette 1re étude pionnière, les approches de microscopie corrélative (CLEM, *Correlative Light and Electron Microscopy*) ont considérablement évolué, intégrant des techniques de fluorescence de plus en plus sophistiquées, comme le confocal, et la super-résolution tel que le STED ou le PALM *(Hagemann et al., 2018; Kopek et al., 2013)*. Ces combinaisons permettent aujourd'hui de relier l'organisation tissulaire globale à l'ultrastructure cellulaire et subcellulaire avec une précision inédite.

I.6.1. Repère relative

En pratique, le workflow commence par l'identification d'une mire servant de repère spatial, où l'origine des coordonnées XY est définie. Les positions d'intérêt sont ensuite localisées et enregistrées, de manière à pouvoir appliquer ultérieurement une transformation spatiale pour la corrélation entre modalités. En microscopie photonique, l'utilisation de billes fluorescentes est courante pour matérialiser ces repères *(Fathima et al., 2021)*. En microscopie électronique, des nanoparticules d'or peuvent être déposées ou incubées sur la lamelle pour assurer leur adhésion et leur visibilité dans les deux modalités *(Fokkema et al., 2018; Mohammadian et al., 2019).*

I.6.2. Transformation spatiale : Translation et rotation

Une fois les positions d'intérêt identifiées à partir des repères relatifs, il est nécessaire d'appliquer des transformations spatiales pour corréler les coordonnées entre différentes modalités d'imagerie. Ces transformations permettent de superposer précisément des images acquises à différentes résolutions ou sur des systèmes distincts, en prenant en compte les rotations, translations et éventuellement les variations d'échelle. Dans la pratique, cette étape repose sur des matrices de transformation homogènes calculées à partir de points fiduciaires visibles dans les deux modalités.

Une fois les positions d'intérêt identifiées à partir des repères relatifs, il est nécessaire d'appliquer des transformations spatiales pour corréler les coordonnées entre différentes modalités d'imagerie. L'objectif est de superposer précisément des images en corrigeant les décalages liés à la translation, à la rotation, aux variations d'échelle, voire au cisaillement. Ces opérations reposent sur des matrices de transformation homogènes calculées à partir de points de mires visibles dans les deux modalités.

En 2D, une matrice homogène combinant rotation θ, translation (t_x, t_y), (x, y) correspondent au coordonnées originales, $(x'y')$ aux coordonnées transformées

$$T_{2D} = \begin{bmatrix} cos\,\theta & -sin\,\theta & t_x \\ sin\,\theta & cos\,\theta & t_y \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \qquad (I.1)$$

En 3D, avec translation (t_x, t_y, t_z) et rotation autour des axes, la matrice homogène devient

$$T_{3D} = \begin{bmatrix} cos\,\theta & -sin\,\theta & 0 & t_x \\ sin\,\theta & cos\,\theta & 0 & t_y \\ 0 & 0 & 1 & t_z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \qquad (I.2)$$

Des transformations plus complexes incluent un facteur de cisaillement $shr(x), shr(y)$ qui permet de corriger une déformation différentielle entre les axes. Une mise à l'échelle uniforme peut être intégrée directement dans la matrice homogène *(Mohammadian et al., 2019)*, donnant par exemple :

$$T = \begin{bmatrix} s_x * cos\,\theta & s_x * sin\,\theta & shr(x) \\ -s_y * sin\,\theta & s_y\, cos\,\theta & shr(y) \\ t_x & t_y & 1 \end{bmatrix} \quad (I.3)$$

où :

- s_x, s_y correspondent au facteurs d'échelle selon les axes X et Y,
- θ : angle de rotation,
- $shr(x), shr(y)$: paramètres de cisaillement, qui corrige les déformations selon l'axe X ou Y
- t_x, t_y translations selon X et Y.

Enfin, des méthodes basées sur des points caractéristiques locaux permettent un recalage automatique :

- *Scale-Invariant Feature Transform (SIFT)* : détecte des points invariants à l'échelle et à la rotation, représentés par des vecteurs de descripteurs $\vec{f_i}$ caractérisant son environnement local. La transformation affine T est calculée en minimisant l'erreur quadratique entre points correspondants : $\min_T \sum_i ||T(\vec{p_i}) - \vec{q_i}||^2$ ou $\vec{p_i}$ et $et\vec{q_i}$ sont des coordonnées appariées dans les deux images *(Cardona et al., 2012)*
- *Multi-Scale Oriented Patches (MOPS)* : extrait des régions à différentes échelles et orientations, puis calcule des descripteurs pour chaque patch. Les correspondances obtenues servent à estimer la transformation affine ou projective *(Brown et al., 2005)*.

La combinaison de ces transformations (translation, rotation, mise à l'échelle, cisaillement et recalage basé sur caractéristiques) permet de superposer précisément des images issues de modalités et de résolutions différentes, condition indispensable à une analyse corrélative multi-échelles fiable *(Paul-Gilloteaux et al., 2017).*

I.6.3. Corrélative multimodale photonique

Malgré un développement de la microscopie corrélative principalement orienté vers la combinaison entre microscopie électronique et microscopie photonique, certaines études ont exploré des approches exclusivement photoniques. Par exemple, une stratégie corrélative combinant plusieurs modalités d'imagerie optique, incluant la microscopie à champ large, la microscopie confocale, le SIM et le STORM a été mise en œuvre *(Pelicci et al., 2023)*.

Ce type d'approche purement photonique présente plusieurs avantages :

- Compatibilité avec les échantillons vivants, grâce à des protocoles de préparation moins contraignants que pour la microscopie électronique.

- Possibilité d’imagerie multi-canaux sur de larges champs, facilitant l’analyse d’interactions entre structures marquées différemment.
- Continuité instrumentale, avec la possibilité d’enchaîner plusieurs acquisitions sur la même plateforme ou via des systèmes compatibles.

En revanche, certaines limites persistent :

- Résolution restreinte par rapport à l’EM, même en super-résolution, en particulier pour les détails ultra-structuraux.
- Sensibilité au photoblanchiment lors de l’acquisition séquentielle sur plusieurs modalités.

Ces considérations ouvrent la voie à des workflows hybrides optimisant les complémentarités, qu’il s’agisse de coupler photonique et électronique, ou de combiner différentes modalités photoniques pour répondre à des questions multi-échelles.

II. De l'imagerie à la donnée

L'imagerie biologique ne se limite plus aujourd'hui à la simple visualisation de structures. Grâce aux avancées des approches de microscopie et au développement d'outils d'analyse computationnelle, elle devient un levier puissant de quantification morphospatiale. Elle vise à extraire des informations métriques et topologiques sur les structures observées à partir d'images haute résolution : dimensions, formes, connectivité, distribution spatiale, ou encore interactions entre compartiments subcellulaires. La transition entre l'image brute et la donnée interprétable implique plusieurs étapes clefs, allant du prétraitement des images (correction du bruit, compensation de la dérive, augmentation de la résolution) à l'extraction de paramètres quantitatifs multi-échelles, exploitables pour des comparaisons inter-échantillons, des analyses statistiques ou des modélisations.

Dans la section suivante, nous détaillerons les principaux types d'informations morphospatiales accessibles via l'analyse d'image, les méthodes utilisées pour leur extraction, et leur application concrète dans le cadre de l'étude des tissus squelettiques sains et pathologiques.

II.1. Nature des images en microscopie

Une image est un signal bidimensionnel permettant de représenter spatialement une information localisée. On distingue généralement deux types d'images : les images analogiques, formées naturellement par l'œil sur la rétine, et les images numériques, générées par des dispositifs de détection.

En microscopie, la formation d'image repose sur la détection des photons émis par les fluorophores ou les harmonophores après excitation. Dans les systèmes à balayage laser, tels que la microscopie confocale ou multiphotonique, la détection des points de scan repose sur des PMT, dont le rendement quantique est généralement de 15 à 25 % dans le domaine visible, avec une sensibilité couvrant une large gamme spectrale allant d'environ 300 à 700 nm. Leurs dérivés plus sensibles, les détecteurs GaAsP, atteignent une efficacité quantique supérieure (jusqu'à 40-45 %), avec une plage spectrale optimale s'étendant de 400 à 650 nm, ce qui améliore significativement le rapport signal/bruit et la détection des faibles signaux de fluorescence *(Jonkman and Brown, 2015b; Zipfel et al., 2003)*.

Dans les systèmes basés sur l'acquisition parallèle du champ, comme la microscopie à feuille de lumière, la SIM ou la SMLM, la détection des signaux est assurée par des caméras sensibles, qu'il s'agisse de caméras à transfert de charge (CCD), de leurs versions amplifiées (*Electron Multiplying* CCD, EMCCD) ou de capteurs plus récents de type *Scientific Complementary Metal Oxide Semiconductor* (sCMOS). Leur rendement quantique atteint généralement 60-70 % pour les CCD classiques, et peut dépasser 90-95 % pour les EMCCD.

Quelle que soit la technologie employée, l'image numérique issue de ces détecteurs est constituée d'un ensemble de valeurs discrètes organisées selon une grille régulière. Chaque unité élémentaire, le pixel (ou voxel en 3D), encode l'intensité lumineuse détectée à une position donnée.

Ce processus implique deux étapes fondamentales : l'échantillonnage spatial et la quantification des intensités *(Gonzalez et al., 2009)*.

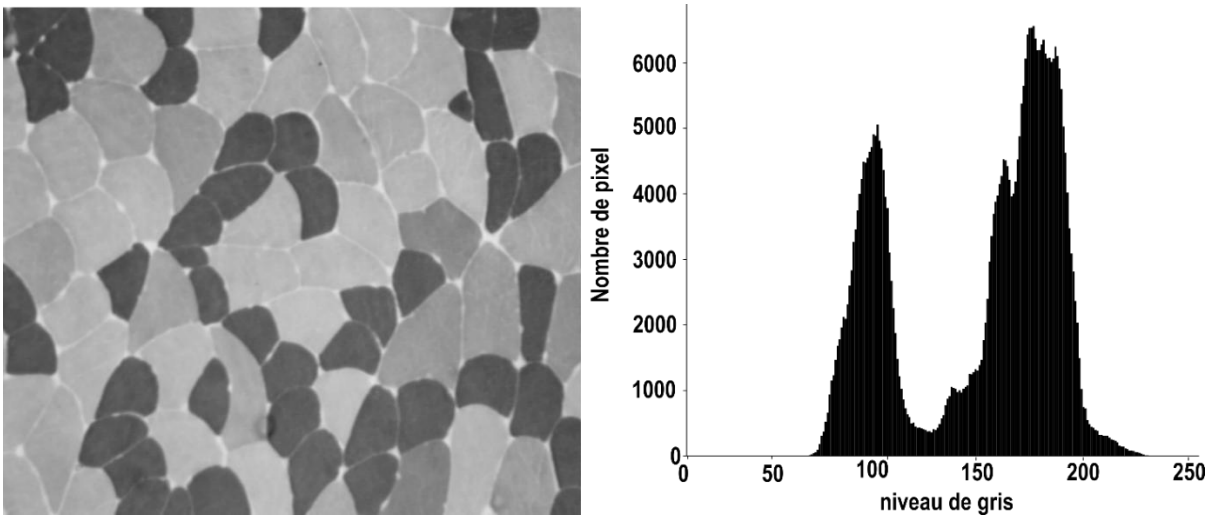


Figure 24 : ***Image en niveaux de gris (8 bits) d'un tissu musculaire****, accompagnée de l'histogramme correspondant de répartition des intensités.*

II.1.1. Echantillonnage et quantification

Échantillonnage spatial

L'échantillonnage consiste à discrétiser l'espace continu en une grille régulière de points, chaque point correspondant à un pixel (en 2D) ou à un voxel (en 3D) *(James B. Pawley, 2006)*. Cette opération dépend à la fois des caractéristiques optiques du système d'imagerie (objectif, longueur d'onde, ouverture numérique) et du dispositif de détection (taille des pixels du capteur, zoom numérique, etc.). Pour que l'image échantillonnée restitue fidèlement les détails de la structure observée, le pas d'échantillonnage doit respecter le critère de Shannon–Nyquist *(James B. Pawley, 2006)* : il doit être choisi de manière à être au moins deux fois inférieur à la plus petite dimension des structures que l'on souhaite détecter.

En microscopie confocale, cela correspond généralement à une taille de pixel comprise entre 100 et 150 nm afin de capturer correctement les détails. Dans le cas des techniques de super-résolution (STED, SIM, SMLM), la résolution latérale accrue impose des pas d'échantillonnage encore plus fins, souvent inférieurs à 50 nm *(Eggeling et al., 2015; Schermelleh et al., 2010)*.

Quantification des intensités

La quantification correspond à la transformation du signal lumineux continu (photons détectés) en une valeur numérique discrète. Cette opération est réalisée par un convertisseur analogique–numérique (CAN), qui attribue à chaque pixel une valeur d'intensité codée sur un certain nombre de bits (8, 12 ou 16) *(James B. Pawley, 2006)*.

Une image codée sur 8 bits possède 256 niveaux de gris (0 à 255). Sur 16 bits, elle en possède 65 536, ce qui permet une dynamique plus large et une meilleure sensibilité aux faibles variations d'intensité. Le choix du codage dépend du type d'échantillon et de la technique utilisée. En microscopie de fluorescence, un codage sur 12 ou 16 bits est généralement recommandé afin de couvrir la plage dynamique du signal tout en minimisant les effets de saturation et de bruit.

II.2. Challenge des images issues de microscopie à fluorescence

Les images de microscopie à fluorescence sont fréquemment affectées par diverses perturbations du signal *(Laine et al., 2021)*. Ces altérations, d'origine multifactorielle, peuvent résulter à la fois de la préparation des échantillons (variabilité de marquage, photoblanchiment, autofluorescence) et des limitations instrumentales (sensibilité des détecteurs, aberrations optiques, diffusion de la lumière). Ainsi, une étape de prétraitement est généralement indispensable afin de corriger le bruit, homogénéiser les niveaux de gris, compenser d'éventuelles dérives temporelles ou spatiales, et appliquer des méthodes de déconvolution pour améliorer la résolution effective des images *(Haider et al., 2016; Laine et al., 2021; Mannam et al., 2022)*.

Parmi les principales sources de bruit, le bruit de Poisson occupe une place importante en microscopie confocale et multiphotonique. Ce bruit, également appelé bruit photonique, est intrinsèquement lié à la nature quantique de la lumière : le nombre de photons détectés suit une statistique de Poisson, induisant une fluctuation d'intensité proportionnelle à la racine carrée du signal. Ce phénomène est particulièrement marqué dans les conditions de faible signal, lorsque la détection repose sur un nombre limité de photons.

À ce bruit fondamental s'ajoutent d'autres composantes telles que le bruit électronique (courant d'obscurité, bruit de lecture des détecteurs) et les artefacts liés à l'optique (diffusion, aberrations chromatiques et sphériques). L'ensemble de ces limitations contribue à dégrader le rapport signal/bruit (SNR) et complexifie l'analyse quantitative des images.

L'application de filtre est requise afin de mettre en évidence les structures d'intérêt, de manière générale, on distingue plusieurs familles d'opérateurs décrits ci-après.

II.2.1. Filtres linéaires

Ils constituent les méthodes classiques de réduction du bruit, reposant sur des opérations de convolution. Les filtres passe-bas, moyenneurs ou gaussiens, atténuent les hautes fréquences, donc le bruit, mais au prix d'un lissage des structures fines. Le filtre médian, souvent employé pour supprimer le bruit impulsionnel, permet également un lissage tout en limitant la perte de détails. Ces approches, simples et rapides, conviennent lorsque le rapport signal/bruit est élevé et que les structures sont bien définies.

II.2.2. Filtres non-linéaires

Ces filtres visent à préserver la richesse morphologique des images tout en réduisant le bruit. Le filtre bilatéral *(Tomasi and Manduchi, 1998)* combine un lissage spatial et une pondération en intensité, permettant de réduire le bruit tout en conservant les contours. La diffusion anisotrope *(Perona and Malik, 1990; Schmidt et al., 2014)* agit comme un filtre sélectif : elle homogénéise les régions uniformes tout en freinant le lissage aux interfaces, garantissant la préservation des bords. Enfin, les filtres morphologiques (érosion, dilatation, ouverture/fermeture) sont adaptés à l'extraction et à l'affinement de formes caractéristiques dans les images biologiques, comme les noyaux, fibres ou réseaux fibrillaires.

II.2.3. Filtres adaptés à la morphologie

Pour les structures présentant une organisation particulière, des filtres spécifiques sont employés. Le filtre de Frangi *(Frangi et al., 1998)*, basé sur l'analyse de la matrice hessienne et de ses valeurs propres, accentue sélectivement les structures tubulaires telles que les vaisseaux sanguins ou les dendrites neuronales. De même, le filtre Laplacien d'une Gaussienne (LoG) peut être utilisé pour mettre en évidence des bordures ou des formes ou régions spécifiques *(Baggett et al., 2022; Gómez et al., 2019; Kong et al., 2013)*. Cette approche combine un lissage gaussien et une détection de contours par dérivation, ce qui permet de renforcer les frontières fines mais au prix d'une sensibilité accrue au bruit.

Ces approches permettent de préparer les images pour des étapes ultérieures, telles que la segmentation ou l'extraction quantitative de paramètres morphologiques, en augmentant la lisibilité et en améliorant le rapport SNR local.

II.3. Segmentation par seuillage

La segmentation constitue l'une des étapes les plus déterminantes du processus d'analyse d'images et qui vient après les opérations de filtrage. Elle permet de délimiter avec précision les structures d'intérêt en s'appuyant sur différentes approches telles que le seuillage, les méthodes basées sur les contours, ou encore les algorithmes d'apprentissage profond. Une fois les régions d'intérêt segmentées, une phase d'identification (ou labelling) est généralement appliquée, notamment à l'aide de voisinages de type V4 (connexité 4) ou V8 (connexité 8), selon que l'on considère uniquement les pixels adjacents selon les axes orthogonaux ou également ceux situés en diagonal *(Gonzalez et al., 2009)*. Ceci afin d'attribuer un label unique à chaque objet détecté. Le résultat de cette opération est le plus souvent une image binaire, où les pixels appartenant aux structures d'intérêt sont affectés à la valeur 1, tandis que le fond est représenté par la valeur 0. Cette représentation constitue la base pour une quantification morphométrique précise des objets biologiques identifiés.

Le choix de la méthode de segmentation dépend directement de la complexité du signal et du SNR. Ainsi, lorsqu'il est élevé et que le signal d'intérêt est clairement différencié du fond, des approches simples comme le seuillage global ou le seuillage par hystérésis (ou seuillage double) peuvent être privilégiées.

Ce dernier, plus robuste que le seuillage simple, permet de détecter des structures connectées même dans des images légèrement bruitées.

D'autres approches plus sophistiquées, comme la méthode proposée par Otsu (1979), constituent une alternative automatique de seuillage. Cette méthode repose sur l'analyse de l'histogramme des niveaux de gris et vise à segmenter l'image en deux classes distinctes (objet et fond) en minimisant la variance intra-classe, ce qui revient mathématiquement à maximiser la variance inter-classe *(Barron, 2020; Otsu, 1979)*. Le critère d'Otsu cherche le seuil t qui maximise la fonction suivante :

$$\sigma^2{}_B = \omega_1(t)\omega_2(t)[\mu_1(t) - \mu_2(t)]^2 \qquad (II.1)$$

où ω_1 et ω_2 représentent les probabilités (ou poids) associées aux deux classes séparées par le seuil et μ_1 et μ_2 sont les moyennes des niveaux de gris pour chaque classe. Cette méthode est particulièrement robuste pour les images dont l'histogramme présente deux pics bien séparés (bimodalité).



Figure 25 : Application des méthodes de seuillage d'Otsu et de Niblack sur une image affectée de bruit de Poisson*. La segmentation du cytoplasme est correctement délimitée avec le seuillage d'Otsu, tandis que la méthode de Niblack, plus sensible au bruit, génère de nombreux petits objets parasites.*

Lorsque le signal est complexe, hétérogène ou fortement bruité, les méthodes de seuillage global montrent leurs limites. La **Figure 25** illustre le seuillage d'une image affectée par un bruit de Poisson, réalisée à l'aide de deux méthodes : le seuillage d'Otsu, relativement peu sensible au bruit de fond, et le seuillage de Niblack, plus sensible aux variations locales et générant de nombreux petits objets parasites. Dans ce type de situation, d'autres approches sont nécessaires pour obtenir une segmentation fiable.

II.4. Segmentation par détection de bords

Outre les méthodes de seuillage, une autre approche puissante pour la segmentation d'images repose sur la détection de bords. Cette méthode vise à localiser les zones de transition rapide d'intensité dans une image, correspondant généralement aux limites des structures d'intérêt (telles que les membranes cellulaires ou les contours d'organites). La détection de bords s'appuie sur le calcul du gradient de l'image, défini par *(Cardullo and Hinchcliffe, 2013; Gonzalez et al., 2009)* :

$$\nabla I = \left(\frac{\partial I}{\partial x}, \frac{\partial I}{\partial y}\right) \qquad (II.2)$$

Où $\frac{\partial I}{\partial x}, \frac{\partial I}{\partial y}$ sont les dérivées partielles selon les directions horizontale et verticale respective. La magnitude du gradient permet de détecter les bords en mesurant l'intensité des variations locales :

$$|\nabla I| = \sqrt{\left(\frac{\partial I}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial I}{\partial y}\right)^2} \qquad (II.3)$$

Plusieurs opérateurs classiques sont utilisés :

- Sobel : il calcule une estimation du gradient dans les directions horizontale et verticale. Il est robuste au bruit et permet une détection simple des contours.
- Prewitt : il est similaire au filtre de Sobel, mais légèrement plus sensible au bruit.
- Canny : Il s'agit d'une méthode plus élaborée, combinant un lissage initial par filtre gaussien, le calcul du gradient, un amincissement non maximal (non-maximum suppression) et une hystérésis pour relier les bords faibles aux bords forts de manière cohérente.

Parmi ces méthodes, l'algorithme de Canny est intéressant pour sa capacité à réduire les faux positifs et à produire des contours nets et continus, même dans des images bruitées.

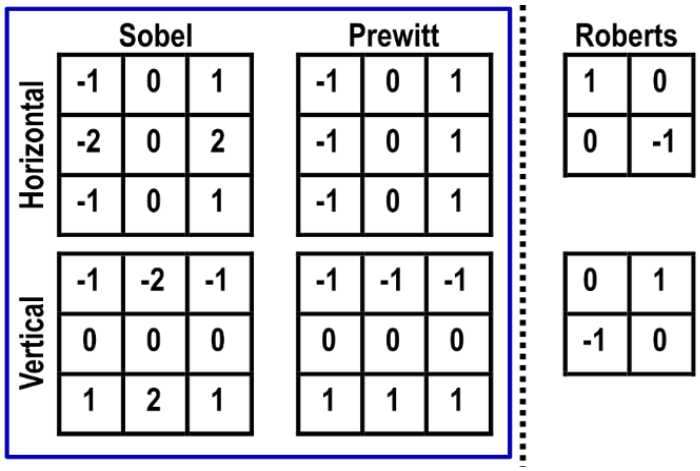


Figure 26 : *Exemples de filtres de convolution couramment utilisés en traitement d'image. Chaque noyau (matrice) permet d'extraire des caractéristiques spécifiques dans l'image, comme les contours, les gradients ou les textures. Ces filtres sont appliqués localement par glissement sur l'image originale. Adapté de Cardullo and Hinchcliffe, 2013*

II.5. Segmentation par région

Une autre famille de méthodes de segmentation repose sur l'exploitation des similarités locales afin de regrouper les pixels en régions homogènes. L'idée est moins de détecter directement les contours que d'identifier des zones cohérentes en intensité, texture ou couleur. Ces approches sont particulièrement utiles lorsque le signal est bruité ou que les limites des structures sont mal définies.

Une autre famille de méthodes de segmentation repose sur l'exploitation des similarités locales afin de regrouper les pixels en régions homogènes. L'idée est moins de détecter directement les contours que d'identifier des zones cohérentes en intensité, texture ou couleur. Ces approches sont particulièrement utiles lorsque le signal est bruité ou que les limites des structures sont mal définies.

Parmi les méthodes les plus utilisées :

- Croissance de régions : cette technique démarre à partir de « germes » (points initiaux) et agrège les pixels voisins partageant des caractéristiques similaires (intensité, texture). Elle est simple mais dépend fortement du choix des germes *(Padmakant Dhage et al., 2015)*.
- Watershed : inspirée de la topographie, cette méthode assimile l'image à un relief dont les intensités représentent des hauteurs *(Smołka, 2005)*. Les lignes de partage des eaux (*watershed lines*) séparent naturellement les bassins, correspondant aux objets d'intérêt. Elle est très efficace mais sensible au bruit, nécessitant souvent un prétraitement (filtrage ou marquage préalable).

Ces méthodes par régions sont particulièrement adaptées aux images fluorescentes complexes, où les objets ne présentent pas toujours des contours nets. Toutefois, elles peuvent générer de la sur-segmentation (trop de petites régions) et nécessitent souvent une étape de post-traitement (fusion de régions, filtrage morphologique).

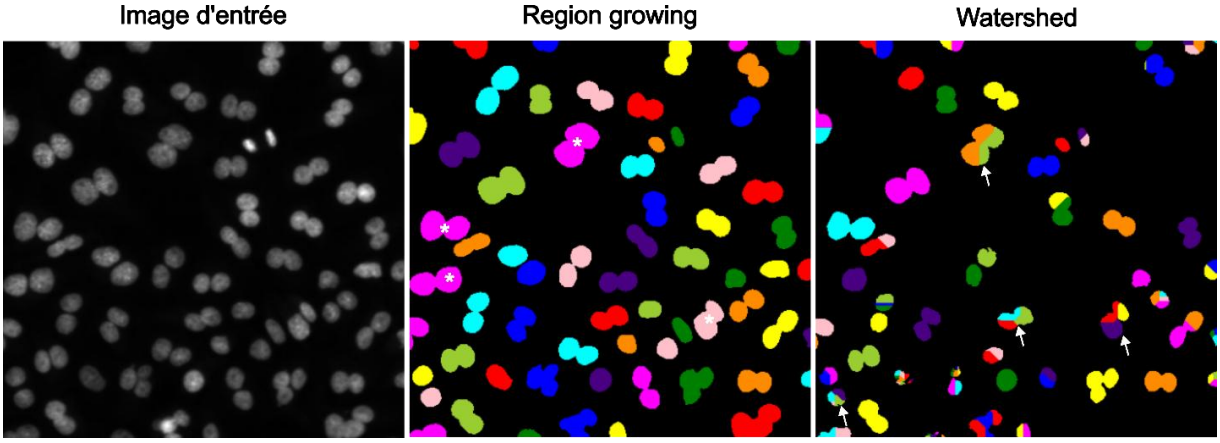


Figure 27 : Illustration de méthode de segmentation*. A gauche, image d'entrée de noyau de cellules. Milieu, application de segmentation region growing. Bonne segmentation, mais certains noyaux très proches ne sont pas séparés (astérix). Droite, segmentation watershed, illustration de sur-segmentation flèches. Adapté de (Meher and Panda, 2020)*

Bien que les méthodes classiques de segmentation, telles que le seuillage, la détection de bords ou les filtres morphologiques, aient longtemps constitué la base de l'analyse d'images, elles présentent plusieurs limites. Leur sensibilité au bruit, leur dépendance à des réglages manuels (par exemple le choix des seuils), ainsi que leur faible robustesse face à la variabilité morphologique rendent leur application délicate, en particulier dans des contextes biologiques complexes et hétérogènes *(Dumur et al., 2019)*.

Pour dépasser ces limitations, les approches fondées sur l'apprentissage profond se sont imposées ces dernières années comme des alternatives puissantes et flexibles *(David and Faure, 2025; Y. Liu et al., 2022).* Grâce à leur capacité à traiter des données complexes, ces méthodes offrent une segmentation plus robuste, précise et généralisable, y compris dans des environnements bruités ou hétérogènes *(Lo Vercio et al., 2022; David and Faure, 2025)*. En outre, elles permettent également de classifier les structures selon des critères de diagnostiques *(Hermsen et al., 2019; Rajinikanth et al., 2023)* ouvrant ainsi la voie à une analyse plus fine et automatisée des images biomédicales.

Dans cette section, nous nous concentrerons sur les réseaux de neurones convolutifs (*Convolutional Neural Network,* CNN), largement utilisés pour la segmentation sémantique d'images. Ces architectures reposent sur des blocs fonctionnels modulaires (convolutions, fonctions d'activation, *pooling*, etc.), également exploités dans d'autres tâches d'apprentissage, telles que la classification, l'amélioration de la qualité des images ou la reconstruction.

II.6. Réseaux de neurones convolutifs

II.6.1. Introduction

L'apprentissage profond ou *deep learning* trouve ses racines dès les années 1960, avec l'introduction du perceptron, un modèle de neurone artificiel proposé par Frank Rosenblatt *(Rosenblatt, 1958)*. Ce modèle, capable d'effectuer des opérations booléennes simples, suscite d'abord beaucoup d'espoir.

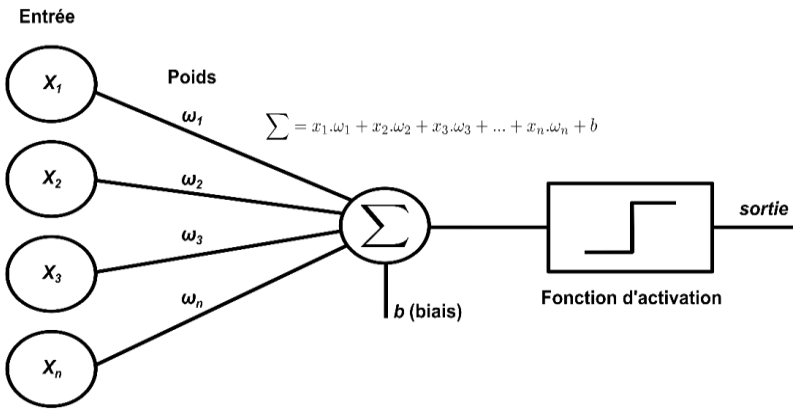


Figure 28 : Modèle de perceptron à une couche*. Le signal d'entrée est pondéré par des poids synaptiques, puis les contributions sont sommées. Le résultat passe ensuite par une fonction d'activation (Heaviside ici), produisant la sortie du neurone (0 ou 1) dans ce modèle.*

Cependant, les limites théoriques du perceptron ont rapidement été mises en évidence, notamment par Marvin Minsky et Seymour Papert dans leur ouvrage Perceptrons (1969), où ils démontrent qu'un perceptron simple est incapable de résoudre des problèmes non linéaires, comme l'opérateur « Ou exclusif » (XOR) *(Minsky and Papert, 1969)*. Ces critiques ont entraîné un net ralentissement de l'intérêt pour ces modèles au cours des décennies suivantes. Il faudra attendre les années 1980-1990 pour assister à une avancée majeure, avec l'introduction de l'algorithme de rétropropagation du gradient (*back propagation*), qui permet l'apprentissage efficace de réseaux de neurones multicouches, ou MLP *(Multilayer Perceptrons* (MLP) *(LeCun et al., 1989; Rumelhart et al., 1986)*. En 1998, Yann LeCun et ses collaborateurs introduisent LeNet-5, l'un des premiers réseaux de neurones convolutifs (CNNs) fonctionnels, entraîné par rétropropagation, qui marque une étape déterminante dans l'application de l'apprentissage profond au traitement d'images *(Lecun et al., 1998)*. Rapidement, les CNNs trouvent des applications prometteuses dans l'imagerie biologique, par exemple pour le phénotypage automatisé du développement embryonnaire, démontrant leur potentiel pour l'analyse morphologique à haute résolution *(Feng Ning et al., 2005)*.

L'essor du *deep learning* a par ailleurs été fortement favorisé par les progrès matériels, notamment avec l'arrivée des processeurs graphiques (GPU), ainsi que par la disponibilité croissante de larges bases de données annotées, telles que MNIST ou ImageNet. Un tournant décisif est survenu en 2012, lorsque le réseau AlexNet, développé par Krizhevsky, Sutskever et Hinton, remporte le concours ImageNet Large Scale Visual Recognition Challenge (ILSVRC), divisant par deux l'erreur de classification par rapport aux méthodes traditionnelles *(Krizhevsky et al., 2017)*. Cet événement est largement considéré comme le point de départ de l'adoption massive des réseaux de neurones profonds dans le traitement d'images *(LeCun et al., 2015).*

II.6.2. Bases des Convolutional Neural Network

Les CNNs comptent parmi les architectures les plus performantes en apprentissage profond, notamment pour les tâches d'analyse d'images *(David and Faure, 2025; Y. Liu et al., 2022; Setu et al., 2022; Smolen and Wooley, 2022)*. La 1re phase, dite d'extraction de caractéristiques, permet au réseau d'apprendre automatiquement des motifs pertinents à différents niveaux de complexité. La 2de phase repose sur la classification de ces caractéristiques extraites.

La force des CNNs réside dans leur capacité à exploiter les corrélations spatiales présentes dans les données d'image. Leur architecture repose sur une succession d'étapes fonctionnelles : couches de convolution, fonctions d'activation, couches de *pooling* (ou sous-échantillonnage), et enfin couches discriminantes *(Zhao et al., 2024)*. Chaque couche d'un CNN applique une transformation spécifique aux données d'entrée. Par exemple, les couches de convolution détectent des motifs visuels caractéristiques tels que des bords, des textures ou des formes à l'aide de filtres spécifiques. Ces caractéristiques sont

ensuite transmises à une fonction d'activation non linéaire, qui introduit de la complexité dans le modèle en permettant la représentation de relations non linéaires entre les pixels.

Si les CNNs ont initialement été développés pour des tâches de classification, ils ont été adaptés avec succès à des applications de segmentation d'images, où la localisation précise de chaque pixel est importante. Dans ce contexte, le modèle U-Net, dont l'architecture en forme de "U" lui a donné son nom (**Figure 29**), introduit par Ronneberger *et al.* en 2015, s'est imposé comme l'architecture de référence pour la segmentation d'images biologiques *(Ronneberger et al., 2015)* (**Figure 29**).

II.6.3. U-net pour la segmentation d'images biologiques

Initialement développé pour la détection et la segmentation de cellules en microscopie en contraste de phase et en microscopie électronique, il a rapidement démontré sa capacité à produire des segmentations précises même à partir d'un nombre limité d'images annotées, ce qui est particulièrement adapté aux contraintes des données biomédicales.

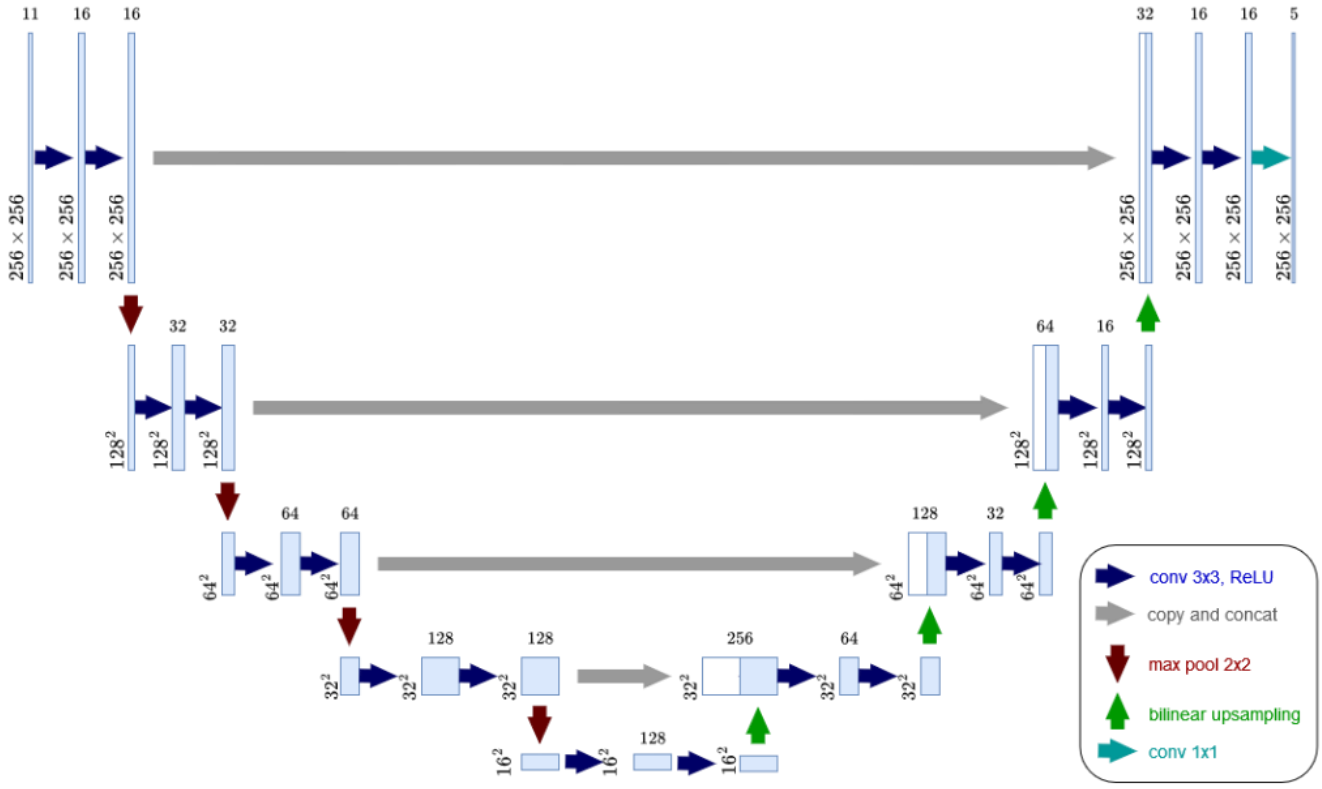


Figure 29 : ***Architecture U-Net Schéma****. Elle se compose d'un encodeur pour capturer le contexte et d'un décodeur pour permettre une localisation précise. Les connexions de saut (skip connections) entre les couches correspondantes de l'encodeur et du décodeur facilitent la récupération des détails spatiaux perdus lors de la contraction. (Ronneberger et al., 2015)*

L'architecture repose sur deux parties principales (**Figure 29**) :

- L'encodeur, qui extrait des caractéristiques à différentes échelles via une succession de convolutions et de sous-échantillonnages (*max-pooling*). À chaque étape, l'information spatiale est réduite, mais l'abstraction sémantique augmente.
- Le décodeur, qui reconstruit l'image segmentée à l'échelle d'origine. Il repose sur des opérations de déconvolution (ou *Upsampling*), associées à des couches de convolution. Une particularité clé du U-Net est l'utilisation de connexions de saut (*skip connections*) entre les couches symétriques de l'encodeur et du décodeur, permettant de récupérer les informations spatiales fines perdues lors de l'encodage.

Cette architecture confère au réseau une double capacité : une compréhension globale du contexte, rendue possible par la profondeur de l'encodeur, et une précision spatiale fine, assurée par les connexions de saut (skip connections) entre les couches symétriques de l'encodeur et du décodeur. Le modèle U-Net s'est imposé comme une architecture de référence pour les tâches de segmentation sémantique, où chaque pixel d'une image se voit attribuer une étiquette correspondant à une classe donnée, permettant ainsi une détection précise des structures biologiques d'intérêt *(Le'Clerc Arrastia et al., 2021)*. Son efficacité a été démontrée dans de nombreuses études en imagerie biomédicale.

Par exemple, le U-Net a été utilisé avec succès pour la segmentation de structures embryonnaires et de noyaux chez la souris, à partir d'images acquises en microscopie lightsheet *(Lo Vercio et al., 2022)*. Plus récemment, il a également été adapté à des modalités plus complexes telles que la microscopie FLIM, où il permet non seulement de prédire les coordonnées du phasor, représentation bidimensionnelle des temps de vie de fluorescence, mais aussi de segmenter efficacement les structures biologiques associées *(Smolen and Wooley, 2022)*. Grâce à sa capacité à capturer des informations à différentes échelles spatiales et à s'adapter à la diversité des données, le U-Net s'impose aujourd'hui comme un modèle particulièrement polyvalent pour l'analyse d'images biomédicales *(Litjens et al., 2017)*.

D'autres dérivés de l'architecture U-Net ont été développés afin de répondre à des besoins spécifiques, tels que l'amélioration de la précision, la prise en compte du contexte global ou encore l'optimisation des performances sur des jeux de données limités. Parmi ces variantes, on peut citer U-Net++, qui introduit des connexions denses entre les couches d'encodage et de décodage pour faciliter la propagation des gradients et améliorer la précision de segmentation *(Zhou et al., 2020)*, ou encore Attention U-Net, qui intègre des mécanismes d'attention pour focaliser l'apprentissage sur les régions pertinentes de l'image *(Oktay et al., 2018)*

Par ailleurs, l'intégration de backbones pré-entraînés issus de modèles CNN de référence tels que VGG, ResNet ou EfficientNet, initialement entraînés sur de vastes corpus d'images naturelles comme ImageNet, permet d'améliorer significativement les performances du U-Net *(Daniel et al., 2022)*. Ces

architectures, riches en représentations hiérarchiques, sont insérées dans le chemin encodeur du U-Net afin d'exploiter des caractéristiques déjà optimisées. Cette approche, relevant du transfert d'apprentissage (*transfer learning*), consiste à adapter les poids préalablement appris à une tâche cible, typiquement en imagerie biomédicale, où la quantité de données annotées est souvent limitée. Outre la réduction du temps d'entraînement, le *transfer learning* renforce la robustesse et la capacité de généralisation du modèle face à des structures complexes et hétérogènes.

La 1re partie de ce manuscrit présente les techniques avancées en microscopie photonique et en analyse d'image, qui permettent aujourd'hui d'explorer des systèmes biologiques complexes à différentes échelles. L'objectif des travaux de thèse était d'accroitre le champ de la connaissance sur la fibre musculaire et de son environnement dans le cadre de la myopathie de Duchenne et de la maladie de Pompe. Pour cela, un *workflow* complet a été développé, couvrant la préparation des échantillons, l'imagerie au microscope et l'analyse des images. La finalité opérationnelle visée à travers cette démarche expérimentale a été de proposer une analyse multi-échelle et multimodale de la structure musculaire afin de mieux appréhender les altérations associées à ces maladies.

III. Muscle strié squelettique en situation physiologique

Le muscle squelettique est un organe essentiel, à la fois moteur du mouvement et soutien de la posture corporelle. Il représente environ 40 à 50 % de la masse corporelle totale avec plus de 600 muscles squelettiques différents répartis dans l'ensemble du corps humain *(Berridge et al., 2018)*. Contrairement aux muscles lisses et au muscle cardiaque, le muscle squelettique est relié aux os par l'intermédiaire de tendons et fonctionne sous le contrôle volontaire du système nerveux central *(Allen et al., 2008)*. Outre sa fonction mécanique, le muscle squelettique joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique de l'organisme *(Knuiman et al., 2015; Li et al., 2024).* Il constitue une réserve importante de substrats métaboliques, tels que les acides aminés et les glucides, mobilisables en cas de besoin *(Li et al., 2024).* Par ailleurs, il est l'un des principaux contributeurs à la production de chaleur corporelle (thermogenèse) et à la consommation d'oxygène et d'énergie, en particulier lors de l'exercice physique *(Rowland et al., 2015; Periasamy et al., 2017; Katare et al., 2022).*

D'un point de vue architectural, le muscle squelettique présente une organisation hiérarchique et modulaire, structurée par des couches successives de tissu conjonctif (**Figure 30**). L'épimysium constitue la couche la plus externe : il enveloppe l'ensemble du muscle et assure son ancrage aux structures adjacentes, notamment aux tendons. Le périmysium pénètre à l'intérieur du muscle et délimite des compartiments appelés faisceaux ou fascicules, chacun contenant entre 10 et 100 myofibres, elles-mêmes individualisées par une fine couche de tissu conjonctif appelée endomysium *(Frontera and Ochala, 2015)*. En section transversale, les fibres musculaires présentent une forme polygonale, en raison de leur agencement serré au sein des faisceaux. Leur diamètre varie généralement entre 10 et 120 µm *(Exeter and Connell, 2010).* En section longitudinale, elles apparaissent allongées, et peuvent atteindre jusqu'à 40 centimètres chez l'humain *(Prasad and Millay, 2021)*.

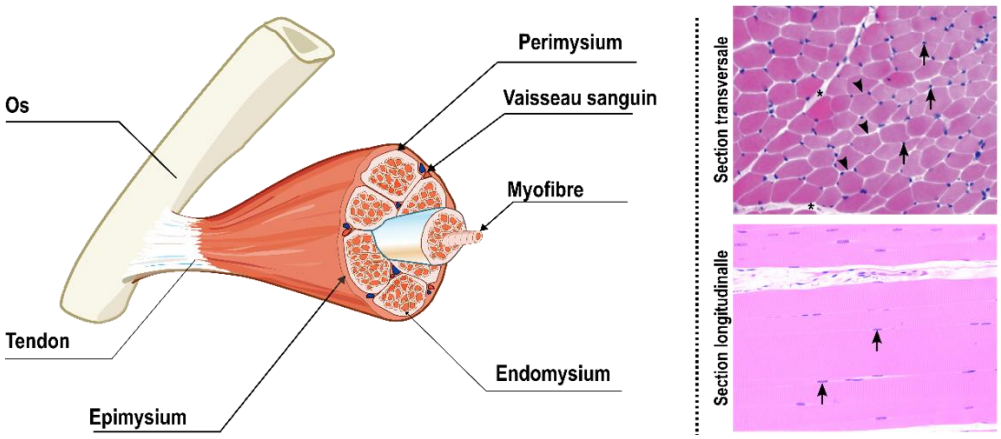


Figure 30 : ***Représentation du muscle squelettique.*** *À gauche, schéma illustrant l'organisation du muscle et de ses différents tissus conjonctifs. À droite, coupes histologiques transversale et longitudinale colorées à l'HES. L'étoile noire indique le périmysium, les tête de flèche l'endomysium, et les flèches simples désignent les noyaux colorés en bleu. Adapté de Gaspar et al., (2019)*

III.1. Vascularisation du muscle

Le muscle squelettique est un tissu hautement vascularisé *(Krogh, 1919),* une caractéristique essentielle pour soutenir ses fonctions métaboliques, notamment lors de l'activité contractile. Cette vascularisation repose sur une organisation hiérarchique des vaisseaux sanguins, principalement constituée par les artérioles et les capillaires (**Figure 31**). Les artérioles, subdivisées en artérioles « feeders » , transverses et terminales, jouent un rôle central dans la régulation du débit sanguin *(Ellis et al., 2005)*. Grâce à leurs capacités de vasodilatation et de vasoconstriction, elles adaptent localement le flux sanguin en réponse aux signaux nerveux, hormonaux, ainsi qu'aux stimuli métaboliques *(Koller and Kaley, 1991; Segal et al., 1989; Segal, 2005).* Les capillaires représentent les plus petits et les plus nombreux des vaisseaux musculaires. Ils forment un réseau anastomotique dense *(Granger and Senchenkova, 2010)*, organisé en mailles rectangulaires autour de chaque myofibre *(Dickie et al., 2006)*. Leur paroi extrêmement fine, constituée d'une seule couche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale, permet des échanges efficaces de gaz, de nutriments et de déchets métaboliques entre le sang et les cellules musculaires.

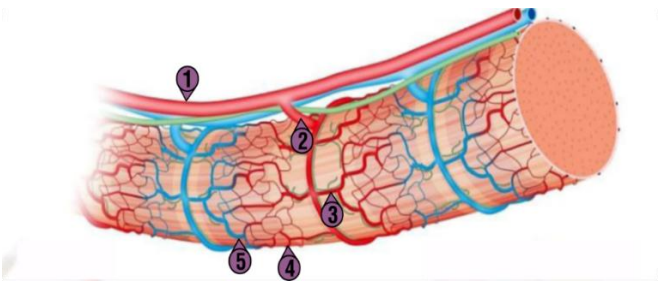


Figure 31 : ***Organisation hiérarchique du réseau vasculaire associé à une myofibre squelettique****. 1) Arcade artériolaire ; 2) Artériole transverse ; 3) Artériole terminale ; 4) Capillaires ; 5) Veinule, adapté à partir de Kusters and Barrett, (2016)*

III.2. Échelle cellulaire et subcellulaire du muscle squelettique

La myofibre constitue l'unité cellulaire fondamentale du muscle squelettique. Il s'agit de cellules de très grande taille, multinucléées, résultant de la fusion de nombreux précurseurs musculaires (myoblastes) au cours du développement embryonnaire, de la croissance post-natale ou lors des processus de régénération après lésion *(Chargé and Rudnicki, 2004; Yin et al., 2013).*

Chaque fibre peut contenir plusieurs centaines à plusieurs milliers de noyaux *(Prasad and Millay, 2021)*. Leur cytoplasme, appelé sarcoplasme, est abondant en protéines contractiles et représente environ 80 % de la masse cellulaire *(Frontera and Ochala, 2015)*. Les noyaux sont localisés en périphérie (**Figure 30**), sous la membrane plasmique, appelée sarcolemme *(Berridge et al., 2018)*. Le sarcoplasme est majoritairement occupé par des structures appelées myofibrilles, organisées parallèlement à l'axe longitudinal de la fibre *(Au, 2004; Berridge et al., 2018).* Chaque myofibrille est formée d'unités répétées appelées sarcomères, qui constituent l'unité contractile fondamentale du muscle squelettique *(Gautel and Djinović-Carugo, 2016; Schiaffino and Reggiani, 2011)*. Ces derniers donnent au muscle son aspect strié caractéristique. Ils sont délimités par deux lignes Z et est constitué de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine, dont l'interaction régulée par la troponine et la tropomyosine sous l'effet du calcium et de l'ATP, permet la contraction musculaire *(Allen et al., 2008; Schiaffino and Reggiani, 2011)*.

La propagation du potentiel d'action le long du sarcolemme entraîne une libération rapide de calcium intracellulaire, via le système des tubules T et le réticulum sarcoplasmique, activant l'appareil contractile selon la théorie des filaments glissants *(Gautel and Djinović-Carugo, 2016).*

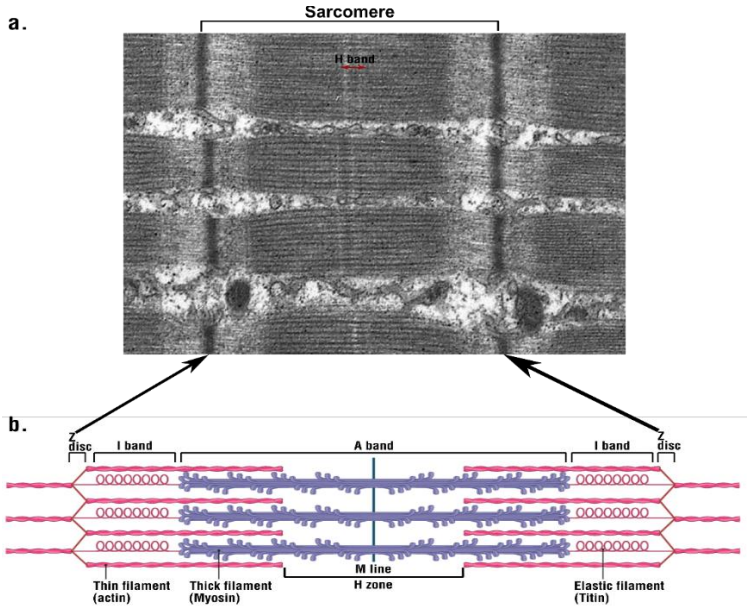


Figure 32 : Organisation longitudinale du muscle squelettique*. a. Image de microscopie électronique à transmission (MET) montrant une coupe longitudinale d'un muscle squelettique. b. Schéma représentatif de l'organisation d'un sarcomère, unité contractile du muscle strié, illustrant les bandes I, A, les lignes Z et les filaments d'actine et de myosine. Adapté à partir de bu.edu et réalisé avec BioRender, modifié avec Inkscape.*

La contraction musculaire est déclenchée par un processus appelé couplage excitation-contraction, qui fait intervenir l'interface fonctionnelle entre le système nerveux et la fibre musculaire : la jonction neuromusculaire (JNM). Les potentiels d'action en provenance des motoneurones provoquent l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans les fibres musculaires. Les ions Ca^{2+} sont responsables d'un changement de conformation au niveau des myofilaments fins permettant d'initier la contraction des myofibrilles *(Shishmarev, 2020; Dowling et al., 2019; Frontera and Ochala, 2015)*.

La contraction musculaire nécessite un apport énergétique important, principalement sous forme d'ATP, pour permettre le glissement des filaments d'actine et de myosine au sein des myofibrilles. Cette dépendance énergétique met en évidence le rôle central des mitochondries, qui assurent la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Leur organisation, leur distribution et leur dynamique intracellulaire sont donc directement liées à l'efficacité de la contraction musculaire et à la physiologie globale du muscle.

Les mitochondries sont des organites intracellulaires dynamiques, délimitées par une double membrane, et couramment désignées comme les « centrales énergétiques » de la cellule *(Lee-Glover et al., 2025)*. Elles présentent un diamètre généralement compris entre 0,1 et 0,5 µm, et une longueur qui peut varier de 1 à 10 µm, selon le type cellulaire et l'état physiologique *(Scheffler, 2007)*. Elle est entourée de deux membranes (**Figure 33**) : une membrane externe lisse qui laisse passer les molécules via le complexe TOM et une membrane interne fortement repliée en crêtes (cristae) abritant les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire (complexes I à IV) ainsi que l'ATP synthase (complexe V), éléments essentiels à la production d'ATP par phosphorylation oxydative *(Frey and Mannella, 2000)*. Les doubles membranes sont délimitées par un espace intermembranaire d'environ 10 à 20 nm de largeur *(Frey and Mannella, 2000).*

La matrice mitochondriale, espace interne contenant des enzymes, de l'ADN mitochondrial (mtDNA) et des ribosomes, est le site de nombreuses réactions métaboliques, dont le cycle de Krebs et la β-oxydation des acides gras. L'organisation structurale des mitochondries est étroitement liée à leur fonction. Ainsi, une mitochondrie très plissée, caractérisée par une densité accrue de crêtes, est généralement plus active sur le plan bioénergétique *(Botella et al., 2023; Nielsen et al., 2017)* . En effet, chez l'être humain, des adaptations telles que l'exercice d'endurance entraînent un accroissement de la surface des crêtes mitochondriales dans les muscles squelettiques, atteignant jusqu'à +23 % par rapport aux individus modérément actifs ou sédentaires *(Nielsen et al., 2017)*.

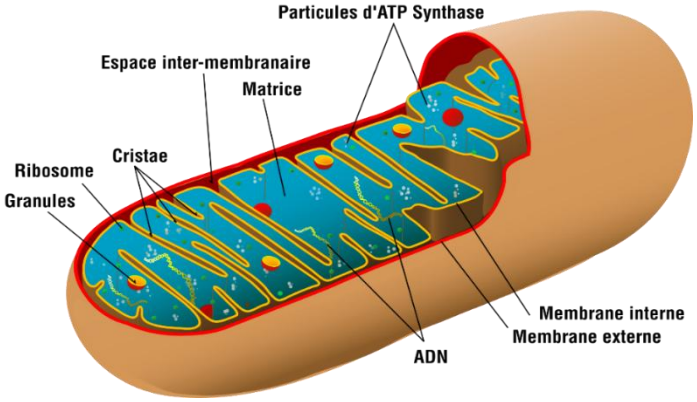


***Figure 33* : Représentation d'une structure mitochondriale**. *Adaptée de (Frey and Mannella, 2000) et adapté à partir de Inskape avec la librairie Wikimédia.*

Au-delà de leur fonction bio-énergétique, les mitochondries interviennent dans de nombreux processus cellulaires essentiels, tels que l'homéostasie calcique *(Naumova and Šachl, 2020; Romero-Garcia and Prado-Garcia, 2019),* la signalisation intracellulaire *(Garbincius and Elrod, 2022; Tait and Green, 2012)*, le contrôle du cycle cellulaire et l'initiation de l'apoptose *(Lee-Glover et al., 2025; Xiong et al., 2014)*. Le réseau mitochondrial est constamment remodelé grâce à des mécanismes dynamiques comme la fusion, la fission et la mitophagie, qui correspond à un processus spécifique d'élimination des mitochondries endommagées afin de répondre aux besoins métaboliques *(Chan, 2020; Youle and Narendra, 2011; Youle and Van Der Bliek, 2012)*.

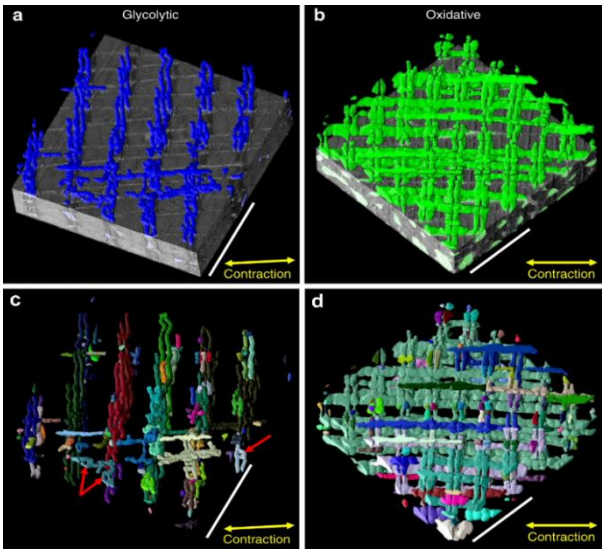


***Figure 34* : Connectivité du réseau mitochondrial dans les muscles de souris.** *(a, c) Réseau mitochondrial segmenté dans une fibre musculaire glycolytique observé en microscopie électronique. Le réseau apparaît moins interconnecté et plus fragmenté (b, d) Réseau mitochondrial d'une fibre musculaire oxydative, caractérisé par une organisation dense et hautement interconnectée, formant une structure en grille. (Bleck et al., 2018)*

Dans le muscle squelettique, les mitochondries jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique. Dans les myofibres, elles forment un réseau dense, interconnecté et finement organisé, dont la distribution spatiale est étroitement corrélée aux besoins énergétiques locaux *(Bleck et al., 2018; Parry et al., 2024; Willingham et al., 2021)*. En coupe transversale, trois principales populations mitochondriales ont été décrites selon leur localisation subcellulaire *(Willingham et al., 2021; Picard et al., 2013; Romanul, 1964)*. Les mitochondries subsarcolemmales (SSM), sont situées immédiatement sous le sarcolemme, les mitochondries intermyofibrillaires (IMF), intercalées entre les myofibrilles au sein du sarcoplasme, et les mitochondries paravasculaires (PVM), localisées à proximité immédiate des capillaires sanguins.

En coupe longitudinale, seules les populations SSM et IMF sont généralement visibles, la composante PVM étant plus difficile à individualiser en imagerie 2D.

Ces populations mitochondriales diffèrent non seulement par leur localisation, mais aussi par leur composition biochimique, leurs fonctions et leur morphologie *(Adhihetty et al., 2005; Ferreira et al., 2010; Parry et al., 2024).* Les SSM sont impliquées dans la production d'ATP pour les besoins énergétiques en périphérie de la fibre musculaire, notamment en lien avec les échanges de substrats avec l'environnement extracellulaire et à l'adaptation de la cellule au stimuli. En revanche, les IMF sont étroitement associées à l'appareil contractile. Elles se situent à environ 100 nm des filaments de myosine, premier site d'hydrolyse de l'ATP lors de la contraction. Cette proximité structurelle leur permet de fournir efficacement l'énergie nécessaire aux cycles de contraction musculaire. *(Glancy et al., 2017; Parry et al., 2024; Willingham et al., 2021)*. Cette organisation mitochondriale est étroitement liée au type de fibres musculaires (**Figure 34**), reflétant les besoins énergétiques spécifiques de chaque type de fibre.

III.2.1. Typologie des fibres musculaires

Le muscle squelettique est constitué de plusieurs types de fibres musculaires, qui se distinguent principalement par l'isoforme de myosine lourde (MyHC) qu'elles expriment. On en identifie quatre types majeurs : I, IIa, IIb et IIx.

Les fibres de type I, également désignées comme fibres lentes oxydatives, se caractérisent par un diamètre relativement réduit, une forte densité mitochondriale et une vascularisation abondante *(Hudlicka, 2011; McAllister et al., 1993; Mishra et al., 2015)*. Elles privilégient un métabolisme aérobie, reposant principalement sur la β-oxydation des acides gras et le cycle de Krebs, permettant une production efficace et soutenue d'ATP. Cette configuration bio-énergétique leur confère une grande endurance et une faible fatigabilité, les rendant particulièrement adaptées aux contractions prolongées et répétées, comme celles observées lors du maintien postural ou d'activités d'endurance modérée *(Exeter and Connell, 2010)*.

À l'opposé des fibres de type I, les fibres de type IIa, IIx et IIb sont qualifiées de fibres rapides, en raison de leur capacité à générer une force contractile élevée en un laps de temps très court *(Exeter and Connell, 2010)*. Elles se distinguent par un diamètre plus important, une densité mitochondriale réduite et une vascularisation moins développée que les fibres lentes oxydatives *(McAllister et al., 1993; Mishra et al., 2015)*. Leur fonctionnement repose majoritairement sur un métabolisme anaérobie, fondé sur la glycolyse rapide, qui permet de produire rapidement de l'ATP nécessaire aux contractions intenses mais brèves. En contrepartie, ces fibres présentent une sensibilité accrue à la fatigue. Cependant, les fibres de type IIa possèdent une capacité oxydative intermédiaire, leur conférant une résistance à la fatigue supérieure à celle des fibres IIx et IIb, qui adoptent un profil plus strictement glycolytique *(Curry et al., 2012)*.

Tableau 4 : *Caractéristiques des différents types de fibre musculaire*

Type de fibre	Vitesse de contraction	Métabolisme	Vascularisation	Mitochondries	Résistance à la fatigue
Type I	Lente	Oxydatif (aérobie)	Élevée	Très élevée	Excellente
Type IIa	Rapide	Oxydatif / Glycolytique	Moyenne à élevée	Moyenne	Bonne
Type IIb	Très rapide	Glycolytique (anaérobie)	Très faible	Très faible	Très faible
Type IIx	Très rapide	Glycolytique (anaérobie)	Faible	Faible	Faible

III.2.2. Homéostasie musculaire

Dans le muscle squelettique, comme dans l'ensemble des cellules eucaryotes, les lysosomes assurent un rôle central dans le catabolisme des macromolécules et le renouvellement des constituants intracellulaires, principalement par le biais de l'autophagie *(Bell et al., 2016; Sandri, 2010)*. Ces organites, enrichis en hydrolases acides, dégradent le contenu des autophagosomes, définis comme des structures à double membrane qui s'englobent autour de composants cellulaires endommagés tels que des agrégats protéiques, des mitochondries dysfonctionnelles ou des fragments cytoplasmiques altérés.

En conditions physiologiques, l'autophagie constitue un mécanisme essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire *(Bell et al., 2016; Moradi et al., 2024)*. Elle participe activement au recyclage des constituants intracellulaires, à l'élimination des débris cytoplasmiques et à la dégradation des organites sénescents. Ce processus est régulé de manière adaptative en réponse à divers stress métaboliques tels que le jeûne, l'exercice ou l'hypoxie contribuant ainsi à préserver l'intégrité structurale et fonctionnelle des fibres musculaires *(Bell et al., 2016; Sandri, 2010)*.

On distingue classiquement trois formes principales d'autophagie (illustrées dans la **Figure 35**) :

- ***La micro-autophagie***, processus au cours duquel de petites portions de cytoplasme sont directement internalisées par invagination de la membrane lysosomale, entraînant leur dégradation intracellulaire.
- ***La macro-autophagie***, forme la plus largement étudiée, qui repose sur la formation de vésicules à double membrane appelées autophagosomes. Ces derniers englobent des constituants cellulaires spécifiques. Ils fusionnent ensuite avec des lysosomes pour former des autolysosomes, au sein desquels leur contenu est dégradé par les enzymes hydrolases.
- ***L'autophagie médiée par les chaperonnes*** (*chaperone-mediated autophagy*, CMA), dans laquelle certaines protéines cytosoliques portant un motif signal pentapeptidique spécifique

(motif KFERQ) sont reconnues par des chaperonnes moléculaires, principalement HSPA8 (ou Hsc70). Ces complexes sont ensuite dirigés vers la membrane lysosomale, où ils interagissent avec le récepteur LAMP-2A, permettant la translocation unidirectionnelle des protéines ciblées vers la lumière lysosomale pour leur dégradation.

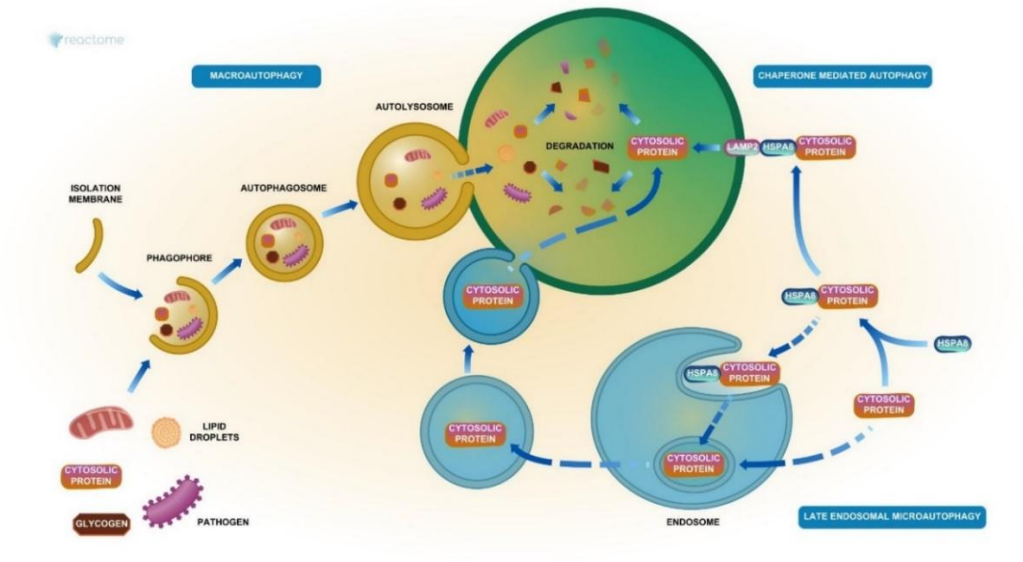


Figure 35 : ***Représentations des trois types d'autophagie****. Macroautophagie : formation d'un autophagosome à double membrane englobant des composants cellulaires (organites, agrégats protéiques), suivi de la fusion avec un lysosome pour la dégradation du contenu. Micro-autophagie : invagination directe de la membrane lysosomale pour capturer et digérer de petites portions du cytoplasme. Autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) : translocation sélective de protéines cytosoliques portant un motif KFERQ vers le lysosome via la protéine chaperonne Hsc70 et son récepteur lysosomal LAMP-2A. (Milacic et al., 2024)*

Dans la suite de ce manuscrit, le terme « autophagie » fera spécifiquement référence à la macro-autophagie, forme la plus largement décrite et étudiée dans le contexte du muscle squelettique.

En parallèle de cette voie générale, des mécanismes d'élimination sélective ciblant certains organites ont été mis en évidence. Parmi eux, la mitophagie désigne un processus d'autophagie sélective dédié à l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles *(Youle and Narendra, 2011)*. Ce mécanisme est essentiel pour préserver l'intégrité fonctionnelle du réseau mitochondrial et maintenir l'homéostasie cellulaire, en particulier dans des tissus à forte demande énergétique comme le muscle squelettique *(Chatzinikita et al., 2023)*. La mitophagie repose sur la reconnaissance des mitochondries altérées, suivie de leur séquestration dans des autophagosomes, puis de leur dégradation après fusion avec des lysosomes *(Youle and Narendra, 2011)*.

Parmi les principaux régulateurs de la mitophagie, la kinase PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) joue un rôle essentiel en tant que capteur du potentiel de membrane mitochondrial. En conditions physiologiques, PINK1 est continuellement importée dans les mitochondries fonctionnelles via les

complexes TOM et TIM. Elle y subit un clivage par la protéase intramembranaire PARL, positionnée entre les résidus Ala103 et Phe104, puis est rapidement libérée dans le cytosol pour être dégradée par le protéasome *(Sekine and Youle, 2018)*. En revanche, lorsque le potentiel transmembranaire est compromis signe d'un dysfonctionnement mitochondrial PINK1 n'est plus importée et s'accumule à la surface de la membrane externe mitochondriale.

Cette accumulation stabilisée de PINK1 constitue un signal de stress qui permet le recrutement de Parkin, une E3 ubiquitine ligase localisée dans le cytosol. Une fois transloquée à la mitochondrie, Parkin est activée par PINK1 et catalyse l'ubiquitination de multiples protéines de la membrane externe mitochondriale (telles que VDAC, Mfn1/2), marquant ainsi l'organite pour sa reconnaissance par les récepteurs autophagiques (comme p62/SQSTM1, NDP52 ou optineurine). Ce marquage favorise ensuite l'encapsulation des mitochondries endommagées dans des autophagosomes, puis leur dégradation après fusion avec les lysosomes *(Sekine and Youle, 2018; Wang et al., 2023)*.

Cette régulation mitochondriale est particulièrement importante dans le muscle squelettique, un tissu métaboliquement actif et structurellement hétérogène, composé de fibres musculaires aux profils contractiles et bio-énergétiques distincts.

Après avoir exploré l'organisation du muscle squelettique en conditions physiologiques, nous allons à présent nous intéresser aux altérations observées dans des contextes pathologiques. Dans un 1er temps, nous aborderons les modifications structurelles et fonctionnelles associées à la DMD, une myopathie d'origine génétique affectant principalement l'intégrité du tissu musculaire. Nous nous pencherons ensuite sur la maladie de Pompe, une myopathie métabolique caractérisée par des altérations majeures à l'échelle subcellulaire, en particulier au niveau des compartiments lysosomaux et mitochondriaux. Un état de l'art des principales méthodologies exploratoires utilisées dans l'étude de ces deux maladies sera présenté, en mettant en lumière leurs apports respectifs, mais aussi leurs limites.

IV. Muscle en conditions pathologiques

IV.1. Dystrophie musculaire de Duchenne

La DMD est une maladie génétique très sévère, avec une incidence estimée entre 1/5000 à 1/6500 garçons nouveau-nés *(Duan et al., 2021)*. Elle est causée par une ou plusieurs mutations dans le gène DMD, qui code la protéine dystrophine, une protéine essentielle à la stabilité et l'intégrité du sarcolemme *(Bushby, 1992; Hoffman et al., 1987)*. Ces mutations entraînent une absence ou une expression très réduite de la dystrophine dans les tissus musculaires *(Bonilla et al., 1988)*.

Le gène DMD, situé sur le bras court du chromosome X (Xp21), est le plus grand gène connu chez l'Homme, avec une taille d'environ 2,4 mégabases qui comprend 79 exons. L'expression du gène DMD est régulée par sept promoteurs spécifiques de tissus, permettant la production d'isoformes distinctes de la dystrophine selon le contexte cellulaire. Parmi eux, trois promoteurs contrôlent l'expression des

isoformes de longueur complète, exprimées dans le muscle squelettique (isoforme Dp427m), les neurones corticaux (isoforme Dp427c), et les cellules de Purkinje (isoforme Dp427p). *(Duan et al., 2021; Venugopal and Pavlakis, 2023)*.

Plusieurs types de mutations peuvent affecter le gène DMD, dont les délétions, les duplications et les mutations ponctuelles. Les délétions représentent environ 60 à 70 % des cas, tandis que les duplications comptent pour environ 10 %, et les mutations ponctuelles pour les 20 à 30 % restants *(Duan et al., 2021)*. Certaines de ces altérations génétiques peuvent provoquer un décalage du cadre de lecture (*frameshift*) ou introduire un codon stop prématuré (mutation non-sens), ce qui conduit à la synthèse d'une protéine tronquée, instable et rapidement dégradée.

IV.1.1. Conséquences liées à l'absence de dystrophine

IV.1.1.1. Complexe protéique associé à la dystrophine

Dans le muscle squelettique, la dystrophine joue un rôle central dans le maintien de l'intégrité du sarcolemme en assurant un lien physique et fonctionnel entre le cytosquelette d'actine et la MEC *(Bonilla et al., 1988; Klietsch et al., 1993; Petrof et al., 1993)*. Ce lien est assuré par un complexe multiprotéique appelé *Dystrophin-Associated Protein Complex*,(DAPC, **Figure 36**), qui assure à la fois la stabilité mécanique de la membrane plasmique et la transduction de signaux mécano-chimiques essentiels à la survie et à la fonction des fibres musculaires *(Allen et al., 2016; Bonilla et al., 1988)*.

Le DAPC est composé de plusieurs sous-unités classées selon leur localisation (**Figure 36**). Du côté extracellulaire, l'α-dystroglycane (α-DG), ancré à la face externe du sarcolemme, agit comme récepteur des composants de la MEC, en particulier la laminine. À travers le sarcolemme, le β-DG relie l'α-DG à la dystrophine intracellulaire. Les sarcoglycanes (SG ; α, β, γ, δ) et le sarcospan forment un sous-complexe transmembranaire qui renforce la cohésion de l'ensemble et participe à la résistance mécanique de la membrane *(Allen et al., 2016)*.

Du côté cytoplasmique, la dystrophine s'ancre à la face interne du sarcolemme et connecte le cytosquelette d'actine au β-DG. Elle interagit également avec la dystrobrévine et les syntrophines, qui assurent l'ancrage de plusieurs protéines de signalisation, dont la nitric oxide synthase neuronale (nNOS). Cette enzyme, normalement localisée au sarcolemme, est cruciale pour la régulation du flux sanguin musculaire, par la production de monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur *(Kobayashi et al., 2008)*.

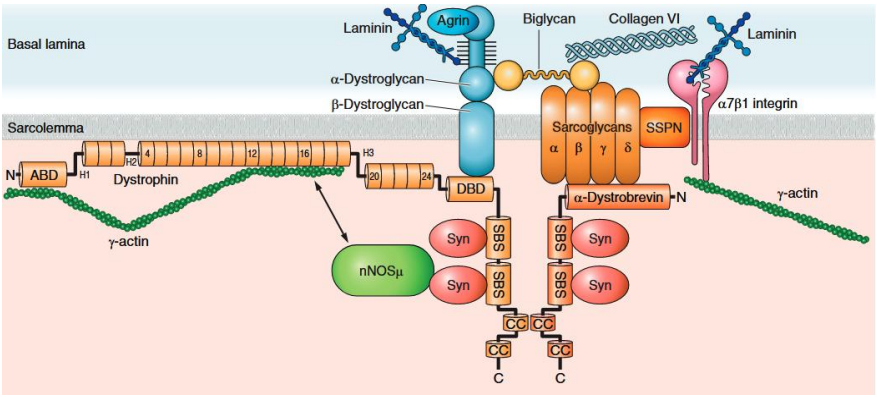


Figure 36 : Le complexe de protéines associé à la dystrophine (DAPC, Dystrophin-Associated Protein Complex). *Représentation schématique du DAPC, un ensemble multiprotéique localisé à la face interne de la membrane sarcoplasmique, assurant un lien mécanique et fonctionnel entre le cytosquelette de l'actine (via la dystrophine) et la matrice extracellulaire (via les laminines). La dystrophine ancre le cytosquelette sous-membranaire à un complexe transmembranaire comprenant les sarcoglycanes (α, β, γ, δ), sarcospan, dystroglycanes (α, β) et les protéines syntrophines et dystrobrevines (Allen et al., 2016)*

IV.1.1.2. Manifestations cliniques

Cliniquement, la DMD se manifeste dès la petite enfance, généralement autour de l'âge de 2 à 3 ans *(Tsuda, 2018)*. Les premiers signes incluent une démarche instable, des chutes fréquentes, ainsi que des difficultés à monter les escaliers ou à se relever du sol *(Tsuda, 2018)*. Ce dernier point est souvent illustré par le signe de Gowers, caractérisé par l'utilisation des mains et des bras pour "escalader" progressivement les jambes afin de se redresser, en raison d'une faiblesse des muscles proximaux des membres inférieurs. La maladie évolue de manière progressive, avec une perte de la marche survenant généralement vers l'âge de 10 à 12 ans, suivie d'une atteinte respiratoire et cardiaque dans les années suivantes, complications qui engagent le pronostic vital *(Duan et al., 2021)*.

IV.1.1.3. Physiopathologie

Avant la mise en évidence du rôle central de la dystrophine, plusieurs hypothèses avaient été formulées pour expliquer la physiopathologie de la DMD. L'une des plus anciennes supposait une origine ischémique, en raison de similitudes entre les lésions observées dans la DMD et celles induites par une occlusion vasculaire *(Mendell et al., 1971)*. Cette hypothèse suggérait un défaut de perfusion comme mécanisme pathogène. Cependant, les progrès en génétique ont permis d'identifier la mutation du gène DMD, codant la dystrophine, comme la cause première de la maladie, reléguant l'hypothèse ischémique à un rôle secondaire *(Bushby, 1992; Hoffman et al., 1987)*.

L'absence de dystrophine rompt le lien mécanique et fonctionnel entre le cytosquelette d'actine, le sarcolemme et la MEC, normalement assuré par le DAPC *(Ervasti and Campbell, 1993)*. Cette rupture fragilise l'intégrité du sarcolemme et entraîne une série d'événements délétères au sein des fibres musculaires.

Lors des cycles de contraction-relaxation, la membrane devient plus vulnérable aux microdéchirures *(Petrof et al., 1993)*, favorisant des entrées massives de calcium intracellulaire (Ca^{2+}) *(Allen et al., 2016; Hopf et al., 2007; Turner et al., 1988)*. Ce dérèglement calcique déclenche à son tour l'activation de voies de stress oxydatif, avec une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) *(Disatnik et al., 1998; Whitehead et al., 2010)*, ainsi que l'activation de protéases telles que les calpaïnes *(Spencer et al., 1995)* et de cascades pro-nécrotiques *(Tidball and Wehling-Henricks, 2007)*. L'accumulation de ces signaux de danger conduit à une inflammation chronique, marquée par l'infiltration de macrophages et la libération de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-6 *(Villalta et al., 2008)*.

À long terme, ces processus convergent vers une dégénérescence progressive des fibres musculaires, suivie de leur remplacement par du tissu conjonctif (fibrose) et du tissu adipeux (adipose) *(Grounds, 2008; Mann et al., 2011)*. Ce cercle vicieux associant instabilité mécanique, dérèglement calcique, stress oxydatif et inflammation constitue le socle physiopathologique de la DMD.

IV.1.1.4. Remaniement tissulaire : Fibrose

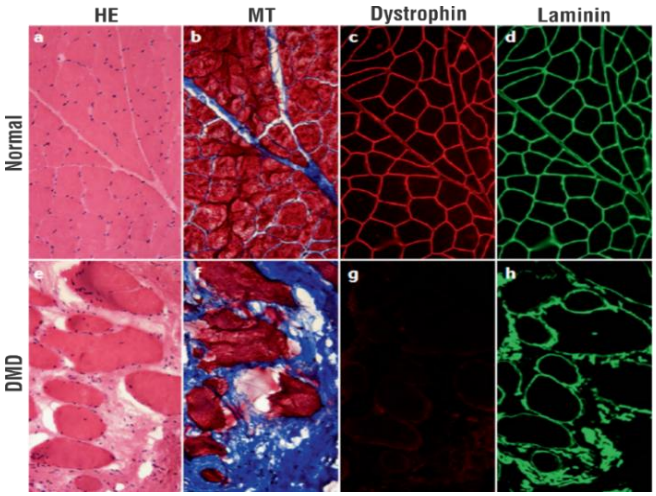


***Figure 37* : Histologie comparée de muscle sain et dystrophique.** *(a-d) Muscle sain ; (e-h) Muscle dystrophique (DMD). (a, e) Coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) : visualisation générale de la structure musculaire. Le muscle sain présente des fibres homogènes et bien organisées. (b, f) Coloration au trichrome de Masson : mise en évidence du tissu conjonctif et de la fibrose (en bleu). Une accumulation marquée de collagène est visible dans le muscle dystrophique. (c, g) Immunofluorescence anti-dystrophine : signal péri-membranaire continu dans le muscle sain, absent dans les fibres dystrophiques, indiquant la perte d'expression de la dystrophine. (d, h) Immunofluorescence anti-laminine : marquage de la lame basale entourant chaque fibre musculaire. La structure est conservée dans les deux conditions, mais le muscle dystrophique présente une organisation désorganisée avec des contours irréguliers. D'après Duan et al., 2021*

Au niveau tissulaire, l'accumulation de stress oxydatif due à la surproduction de ROS entraîne l'activation de voies apoptotiques dans les fibres musculaires dystrophiques *(Disatnik et al., 1998; Whitehead et al., 2010)*. Parallèlement, le cycle chronique de dégénérescence et de régénération musculaire propre à la DMD s'épuise progressivement *(Blau et al., 1983; Dumont et al., 2015; Webster and Blau, 1990)*. Avec le temps, les cellules satellites, essentielles à la régénération, perdent en efficacité et en nombre, ce qui entraîne un remplacement progressif des fibres musculaires lésées par du tissu conjonctif et adipeux *(Desguerre et al., 2009a; Duan et al., 2021; Grounds, 2008)*.

La fibrose musculaire qui en résulte se manifeste par une accumulation excessive de collagène de type I et III dans l'espace interstitiel (**Figure 37**), réduisant la synchronisation du tissu musculaire et perturbant la transmission de la force contractile *(Brashear et al., 2021)*. Ces altérations structurelles aggravent la perte de fonction musculaire, augmentent la raideur

tissulaire et contribuent à la progression du handicap moteur observé chez les patients atteints de DMD *(Brashear et al., 2022, 2021)*.

IV.1.1.5. Désorganisation vasculaire et hypoxie chronique

Dans la DMD, l'absence de dystrophine entraîne non seulement une fragilité du sarcolemme, mais aussi des altérations profondes de la vascularisation musculaire. Un mécanisme central repose sur la perte de la nNOS, normalement recrutée au sarcolemme par la dystrophine via le DAPC. Cette perte réduit la production locale de NO, un puissant vasodilatateur, compromettant la vasodilatation dépendante de l'activité musculaire *(Kobayashi et al., 2008; Percival et al., 2008)*. Il en résulte une hypoperfusion musculaire, limitant l'apport en oxygène et en nutriments lors des contractions répétées.

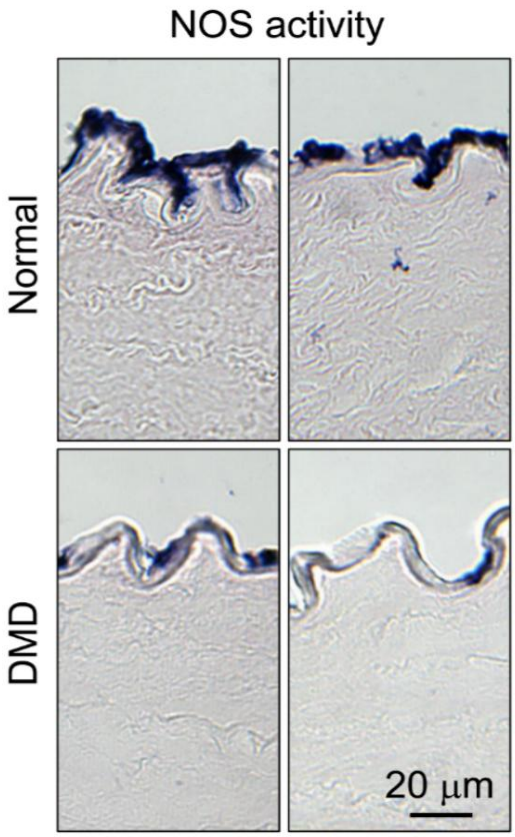


Figure 38 : Evaluation histologique de l'expression de l'enzyme eNOS*. Activité du NOS réduit chez le chien GRMD (Kodippili et al., 2021)*

En parallèle, la nitric oxide synthase endothéliale (eNOS), exprimée par les cellules endothéliales vasculaires, joue également un rôle essentiel dans la régulation du tonus vasculaire. Des études menées sur la souris *mdx,* principale modèle murin de la DMD *(McGreevy et al., 2015),* ont mis en évidence une diminution de l'expression de la eNOS, associée à une résistance artérielle accrue et à une diminution de la réponse aux stimuli mécaniques tels que le shear stress *(Loufrani et al., 2004)*.

Dans le modèle canin *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (GRMD), une perte marquée de l'activité NOS a également été rapportée au niveau de l'artère fémorale (**Figure 38**), s'accompagnant d'un rétrécissement de la lumière vasculaire et d'un épaississement de la paroi, traduisant une atteinte vasculaire structurelle *(Kodippili et al., 2021).* Ces anomalies participent à une hypoxie chronique dans certaines régions musculaires, contribuant à la progression des lésions et à la dégénérescence des fibres musculaires.

Au-delà des troubles fonctionnels liés à la perfusion, des altérations structurelles majeures du réseau vasculaire sont également rapportées dans la DMD. Bien qu'un consensus ait été établi concernant l'hypo-vascularisation du muscle dystrophique, la nature précise des altérations morphologiques demeure à élucider.

Une étude réalisée chez le chien GRMD a mis en évidence une diminution de la densité capillaire dans certains muscles, associée à une accumulation anormale de MEC *(Nguyen et al., 2005)*. Une telle

corrélation entre hypovascularisation et fibrose interstitielle a également été observée chez des patients DMD *(Desguerre et al., 2009a)*. Par ailleurs, des études conduites chez la souris *mdx* rapportent une architecture vasculaire anormalement ramifiée, caractérisée par une multiplication désorganisée de vaisseaux fins, accompagnée de défauts de perfusion *(Latroche et al., 2015)*. Ces anomalies traduisent un échec de l'angiogenèse compensatoire : au lieu de régénérer un réseau capillaire fonctionnel, le processus aboutit à un agencement vasculaire dysfonctionnel, qui s'aggrave au fil de la progression de la maladie. En parallèle, la fibrose interstitielle, particulièrement marquée dans les muscles dystrophiques, perturbe l'interface entre les vaisseaux et les fibres musculaires, entravant les échanges métaboliques et favorisant un état d'hypoxie chronique *(Desguerre et al., 2009a)*.

IV.1.1.6. Désorganisation des organites

À l'échelle subcellulaire, l'absence de dystrophine se traduit par une désorganisation profonde de l'architecture interne de la fibre musculaire. Les mitochondries comptent parmi les organites les plus affectés, présentant des anomalies morphologiques et structurales marquées : gonflement, fragmentation, perte de densité des crêtes et altération de leur alignement par rapport au réseau myofibrillaire *(Moore et al., 2020; Percival et al., 2013)*. Au-delà de ces altérations morphologiques, des perturbations majeures des mécanismes de renouvellement mitochondrial ont été mises en évidence. Il a été montré que la mitophagie et l'autophagie sont significativement compromises dans le muscle des souris *mdx*. Une analyse de l'expression des ARNm a révélé une forte diminution des gènes associés à la mitophagie, tels que Pink1 et Parkin, ainsi qu'une réduction marquée de l'expression des gènes indispensables aux processus d'autophagie (Becn1, Atg5, Map1lc3b et p62) *(Sebori et al., 2018)*. Des résultats similaires ont été rapportés dans les cardiomyocytes de souris *mdx*, où une diminution de la production d'ATP a été observée, parallèlement au développement de cardiomyopathie. L'expression de protéines reliées à l'autophagie s'est avérée accrue, cependant la mitophagie est inhibée. Une mise en évidence d'une réduction des niveaux de plusieurs protéines impliquées dans la voie PINK1/PARKIN a également été établie, ainsi qu'une phosphorylation quasi inexistante de la protéine PARKIN lors de l'induction de la mitophagie *(Kang et al., 2018)*.

Comme exposé dans les sections précédentes, le muscle dystrophique présente un ensemble d'altérations morphologiques et fonctionnelles d'une grande complexité, témoignant de la multiplicité des mécanismes physiopathologiques impliqués. Ces altérations touchent de manière coordonnée plusieurs niveaux d'organisation : de la désorganisation des myofibres et de l'architecture vasculaire à l'accumulation de MEC, en passant par les perturbations métaboliques et inflammatoires. Pour appréhender cette complexité, des outils d'imagerie adaptés à chaque échelle sont nécessaires. La section suivante s'attache ainsi à présenter les modalités d'imagerie mobilisées pour explorer le muscle dystrophique, en insistant sur les défis liés à la préservation de la structure 3D et en se focalisant sur les altérations au niveau de la fibrose et vascularisation.

IV.1.2. Imagerie et caractérisation du muscle dystrophique

Bien que largement utilisées, les approches histologiques conventionnelles présentent des limites pour l'exploration fine des altérations tissulaires complexes du muscle dystrophique, en particulier en ce qui concerne la fibrose. Les colorations classiques, telles que le trichrome de Masson ou le *picrosirius red*, permettent d'évaluer et de quantifier la surface occupée par la fibrose. Toutefois, ces méthodes restent essentiellement globales : elles renseignent sur l'étendue du dépôt de MEC mais ne permettent pas d'accéder à l'organisation 3D ni à l'architecture des fibres de collagène, paramètres pourtant essentiels dans la rigidification progressive du muscle atteint de la DMD *(Brashear et al., 2022)*.

Face à ces limitations, l'imagerie multiphotonique, notamment via la SHG, constitue une alternative puissante. Elle permet une visualisation 3D du réseau de collagène, sans marquage exogène. Contrairement aux techniques conventionnelles, la SHG permet de quantifier de manière objective des paramètres clés tels que la densité, l'orientation, la continuité et la répartition du collagène, tout en respectant l'intégrité structurelle du tissu.

En cela, l'UMR a mis en évidence, en utilisant l'imagerie multiphotonique sur du tissu cardiaque dystrophique, une désorganisation 3D du réseau collagénique qui échappait à l'analyse histologique standard *(Pichon et al., 2022)*. Par ailleurs, d'autres travaux ont démontré que les fibres de collagène contribuent activement à la rigidification du muscle à travers la formation de liaisons covalentes interfibrillaires (*cross-links*), un phénomène pathologique dans la DMD que les méthodes d'imagerie conventionnelles peinent à caractériser *(Brashear et al., 2022, 2021; Dubreil et al., 2023)*.

Ainsi, dans un contexte où la fibrose constitue un marqueur central de progression pathologique, l'imagerie multiphotonique se présente comme un outil indispensable pour une analyse morphologique fine, quantitative et 3D du muscle dystrophique, là où les techniques traditionnelles atteignent rapidement leurs limites.

Au même titre que la fibrose, l'étude de la vascularisation dans le muscle dystrophique reste largement tributaire de méthodes d'imagerie histologique conventionnelles en 2D sur coupes minces *(Loufrani et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Desguerre et al., 2009b; Latroche et al., 2015)*. Si ces approches permettent d'évaluer la densité vasculaire ou de détecter certaines anomalies morphologiques (diamètre, distribution), elles sont limitées dans l'interprétation globale du réseau vasculaire. En particulier, elles ne permettent ni de reconstituer la topologie 3D du réseau qui est dense et très ramifiée *(Dickie et al., 2006)*, ni de mesurer précisément des paramètres tels que la tortuosité, la ramification, la connectivité ou encore la relation spatiale avec les autres compartiments tissulaires (fibres, fibrose, zones nécrotiques).

Ces limites méthodologiques sont d'autant plus importantes que la modulation pharmacologique de la perfusion sanguine ou du lit vasculaire constitue une stratégie thérapeutique prometteuse pour améliorer le phénotype de la DMD. Par exemple, l'administration d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion

de l'angiotensine (*IEC/ACE inhibitors*), un vasorelaxant, chez de jeunes patients atteints de DMD a permis de retarder la survenue des complications cardiaques associées à la maladie, et de réduire la mortalité *(Duboc et al., 2007, 2007).* Des résultats similaires ont été observés chez le modèle murin *mdx*, avec une amélioration significative de la contractilité cardiaque après traitement *(Bauer et al., 2009)*. Par ailleurs, l'induction de l'angiogenèse, notamment via la modulation du facteur de croissance vasculaire VEGF, constitue une autre piste thérapeutique. L'inhibition du récepteur Flt-1 (VEGFR-1), un régulateur négatif de l'activité angiogénique du VEGF, a permis d'augmenter la densité vasculaire, d'améliorer la perfusion et de réduire la fibrose dans le muscle dystrophique de souris *mdx (Bosco et al., 2021; Verma et al., 2019, 2010).*

Ainsi, la caractérisation du lit vasculaire à l'aide de méthodes d'imagerie 3D, capables de restituer l'architecture complexe du réseau vasculaire dans son intégralité, apparaît comme une nécessité. De plus, cette approche doit s'accompagner d'outils d'analyse adaptés pour quantifier finement les propriétés morphologiques et topologiques du réseau (tortuosité, connectivité, ramification, etc.). Dans ce contexte, la microscopie multiphotonique se révèle particulièrement adaptée : elle permet l'imagerie en profondeur de tissus épais, tout en offrant la possibilité de visualiser simultanément la vascularisation via la fluorescence à deux photons (2PEF) et la fibrose grâce au signal d'émission par la SHG, sans marquage exogène pour cette dernière.

IV.2. Maladie de Pompe

IV.2.1. Définition

La maladie de Pompe, également appelée glycogénose de type II, est une maladie neuromusculaire génétique rare appartenant au groupe des maladies de surcharge lysosomiale *(Platt et al., 2018)*. Elle est due à une mutation sur le gène codant l'acide alpha-glucosidase (GAA), une enzyme lysosomale indispensable à la dégradation du glycogène en glucose. Il en résulte un déficit d'activité enzymatique à l'origine d'une accumulation excessive de glycogène dans les lysosomes des cellules, notamment celles des muscles squelettiques, cardiaques et respiratoires (**Figure 39**).

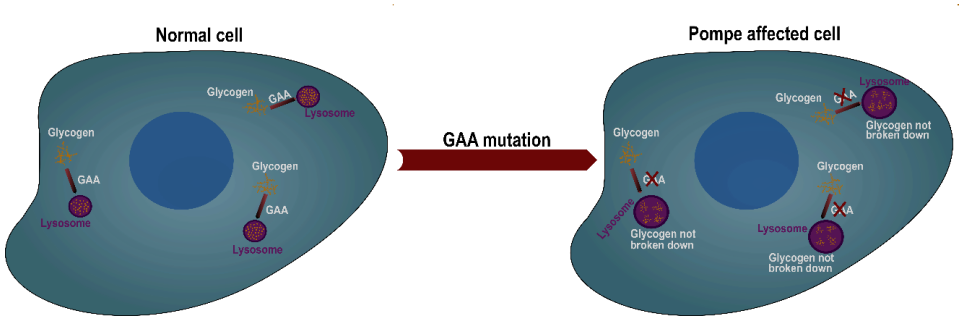


***Figure 39* : Représentation schématique de l'accumulation de glycogène au sein de la cellule.** *Adapté de (Taverna et al., 2020)*

L'incidence de la maladie varie selon les méthodes de dépistage et les populations étudiées. Les programmes de dépistage néonatal de nouvelle génération estiment une incidence d'environ 1 cas pour 18 700 naissances vivantes, tandis que les estimations antérieures, fondées sur des données cliniques, rapportaient une fréquence plus basse, de l'ordre de 1 pour 40 000. Cette variabilité s'explique également par des facteurs ethniques et géographiques : chez les populations afro-américaines, l'incidence peut atteindre 1 pour 14 000, alors qu'elle reste plus faible dans certaines régions d'Europe (environ 1 pour 100 000).

IV.2.2. Manifestations cliniques

Le phénotype clinique dans la maladie de Pompe est étroitement corrélé à l'activité enzymatique résiduelle de la GAA ainsi qu'à l'âge d'apparition des symptômes *(van der Ploeg and Reuser, 2008)*. Plus cette activité est faible, plus les manifestations cliniques surviennent précocement et sont sévères. La forme infantile classique (*Infantile-Onset Pompe Disease*, IOPD), qui représente la forme la plus grave de la maladie, débute dès les premiers mois de vie et se caractérise par une activité enzymatique résiduelle inférieure à 2 % *(Van Den Hout et al., 2003; van der Ploeg and Reuser, 2008)*. Elle se manifeste par une hypotonie généralisée sévère, une cardiomyopathie hypertrophique et une insuffisance respiratoire rapide. Cliniquement, cette hypotonie est notamment révélée chez les nourrissons par le test du « *floppy baby* », qui consiste à soulever l'enfant par les bras : l'incapacité à maintenir la tête droite illustre alors la faiblesse musculaire axiale (**Figure 40**). En l'absence de traitement, l'évolution est rapidement fatale au cours de la 1re année de vie.

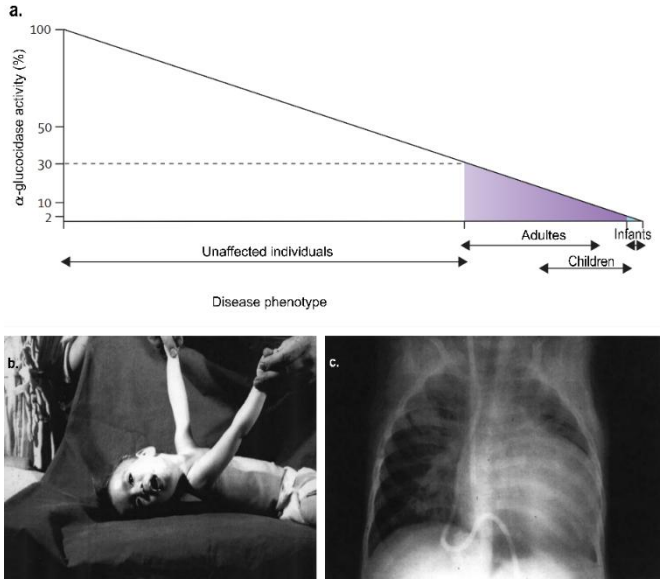


Figure 40 : Corrélation du phénotype de la maladie de Pompe en fonction du niveau d'activité de l'enzyme GAA et manifestation clinique*. a. courbe de représentation de l'activité enzymatique de la l'acide alpha-glucosidase (GAA) en fonction du phénotype. D'après van der Ploeg and Reuser, 2008. b. Hypotonie profond de patiente âgée de 7 mois. c. Hypertrophie cardiaque de patient âgée de 5 mois, (Kishnani and Howell, 2004).*

À l'inverse, les formes dites tardives (*Late-Onset Pompe Disease*, LOPD) apparaissent à un âge plus avancé, de l'enfance à l'âge adulte, et sont associées à une activité enzymatique résiduelle comprise entre 2 % et 30 %. Ces formes évoluent plus lentement et se traduisent principalement par une faiblesse musculaire progressive, touchant préférentiellement les muscles proximaux, axiaux et respiratoires, sans atteinte cardiaque significative.

IV.2.3. Histopathologie de la surcharge en glycogène

En situation physiologique, le glycogène représente la principale forme de réserve glucidique dans l'organisme, particulièrement dans le muscle squelettique et le foie. Dans le muscle, il constitue une source énergétique rapidement mobilisable, essentielle à la contraction musculaire, notamment lors d'efforts intenses ou prolongés. Le glycogène est stocké sous forme de granules cytoplasmiques localisés dans plusieurs compartiments : sous le sarcolemme, proche de la membrane cellulaire, entre les myofibrilles, où il est le plus abondant et à l'intérieur des myofibrilles, en contact direct avec les structures contractiles *(Fridén et al., 1989; Nielsen and Ørtenblad, 2013)*.

La dégradation du glycogène via la glycogénolyse, permet la libération rapide de glucose-6-phosphate, qui alimente la glycolyse anaérobie ou aérobie, selon l'état d'oxygénation et l'intensité de l'effort. Cette flexibilité métabolique confère au glycogène musculaire un rôle central dans l'homéostasie énergétique *(Katz, 2023)*.

Chez les patients atteints de l'IODP, le défaut d'activité enzymatique de la GAA entraîne une accumulation massive de glycogène au sein des lysosomes, provoquant une surcharge progressive dans de nombreux tissus incluant le cœur, le muscle squelettique, le muscle lisse, le système nerveux, le foie, les reins, la rate, les cellules endothéliales, les cellules de Schwann *(Thurberg et al., 2006; van der Ploeg and Reuser, 2008)*.

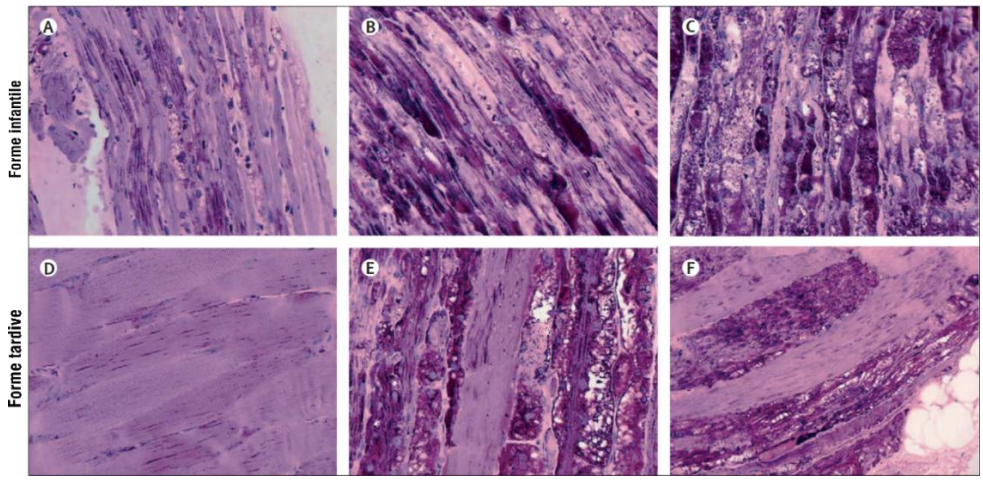


Figure 41 : Surcharge en glycogène mise en évidence par la coloration Periodic Acid-Schiff (PAS) sur des coupes de biopsies musculaires de patients atteints de la maladie de Pompe*. (A, B) Patients atteints de la forme infantile classique, âgés de 2,5 mois. Le patient B présente une atteinte plus sévère que le patient A. (C) Patient atteint de la forme infantile, âgé de 8 mois, avec une atteinte manifeste comparée aux cas A et B plus jeunes. (D) Patient atteint de la forme tardive, présentant une surcharge glycogénique modérée. (E, F) Patients atteints de la forme tardive, montrant une surcharge plus marquée. D'après van der Ploeg and Reuser, 2008*

Cette accumulation induit une distension lysosomiale marquée, responsable d'une désorganisation progressive des structures cellulaires, avec altération du cytosquelette, compression des organites et perturbation globale de l'architecture intracellulaire (**Figure 41**).

Dans la LOPD, bien que l'activité enzymatique résiduelle soit partiellement conservée, une accumulation de glycogène subsiste, notamment dans les fibres musculaires. Bien que plus lente et plus diffuse, la surcharge finit par entraîner une altération progressive des fonctions cellulaires, en particulier dans les muscles locomoteurs et respiratoires *(Toscano et al., 2019)*. La désorganisation des compartiments intracellulaires est moins brutale que dans l'IOPD, mais elle contribue néanmoins à une atteinte musculaire chronique, entraînant à long terme une perte d'autonomie motrice et des complications respiratoires.

IV.2.4. Perturbations de l'autophagie

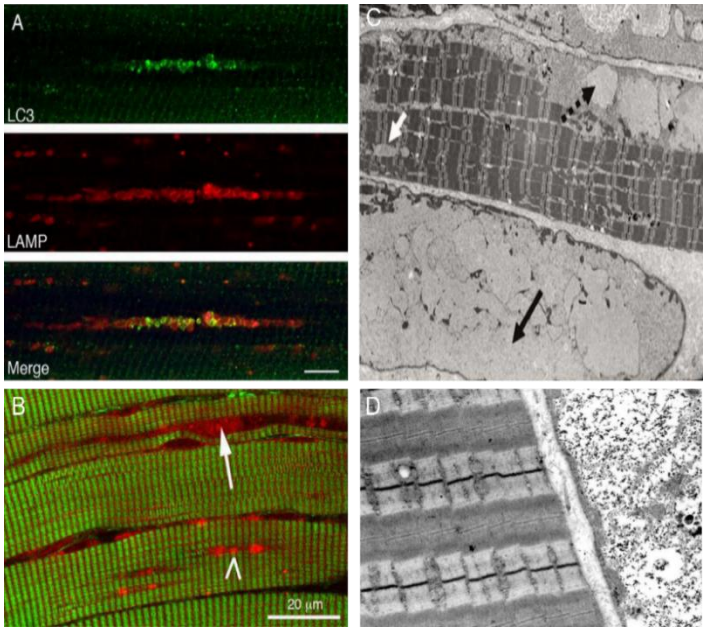


Figure 42 : Altération du processus autophagique et désorganisation cellulaire. *(A) Fibre musculaire de patient immunomarquée pour les autophagosomes (LC3) et les lysosomes (LAMP). Une vacuole autophagique visualisée au centre de la fibre, témoignant d'un blocage du flux autophagique. (B) Imagerie multiphotonique d'un muscle de patient : les bandes de myosine, visualisées par génération de seconde harmonique (SHG), présentent un désalignement marqué en présence de lysosomes surchargés. (C-D) Observations en microscopie électronique. (C) La fibre située en haut est partiellement atteinte : les éléments contractiles sont encore présents, bien que du glycogène infiltré soit visible (flèche pointillée). La fibre située en bas (flèche noire) est totalement désorganisée, avec une perte complète des structures contractiles, remplacées par du glycogène. (D) La fibre de gauche est relativement préservée, malgré la présence de glycogène infiltré, tandis que celle de droite est complètement détruite. (Kishnani and Howell, 2004; Raben et al., 2010; Thurberg et al., 2006)*

Dans la maladie de Pompe, l'autophagie est profondément altérée (**Figure 42**). L'accumulation rapide et progressive de lysosomes surchargés en glycogène conduit à la formation de vacuoles autophagiques, fréquemment localisées au centre des fibres musculaires *(Fukuda et al., 2006a; Lagalice et al., 2018; Thurberg et al., 2006)*, Cette surcharge perturbe le bon déroulement du flux autophagique, notamment en compromettant la capacité des lysosomes à fusionner efficacement avec les autophagosomes, ce qui entraîne une accumulation de matériel non dégradé et contribue à la désorganisation des myofibres *(Raben et al., 2010)*.

De plus, cette altération de l'autophagie semble varier en fonction du métabolisme des fibres musculaires. En effet, plusieurs études menées sur des modèles murins ont mis en évidence des différences de localisation, de répartition et de taille des accumulations autophagiques selon le type de fibre *(Fukuda et al., 2006b; Raben et al., 2006)*. Ces observations suggèrent une susceptibilité différentielle des fibres oxydatives et glycolytiques face au dysfonctionnement lysosomal (**Figure 43**).

Toutefois, ces variations ont été rapportées de manière qualitative, sans qu'une quantification systématique et comparative n'ait été établie à ce jour.

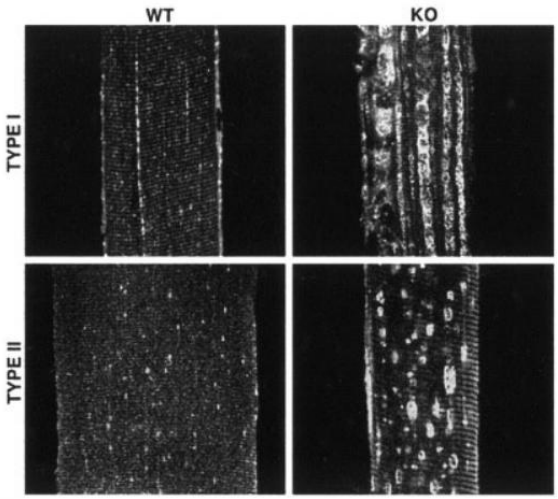


Figure 43 : Représentation des altérations du flux autophagique dans le muscle squelettique de souris modèles de la maladie de Pompe, en fonction du métabolisme des fibres*. Les fibres oxydatives (type I), présentent généralement des vacuoles autophagiques de grande taille, centrées dans la fibre. En revanche, les fibres glycolytiques (type II), montrent des vacuoles plus petites, souvent dispersées de manière hétérogène. (Fukuda et al., 2006b).*

IV.2.5. Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif

Outre les altérations lysosomiales et autophagiques, des dysfonctionnements mitochondriaux longtemps négligés ont été rapportés dans la maladie de Pompe. L'une des premières observations réalisées en microscopie électronique a révélé des anomalies morphologiques mitochondriales, notamment une taille augmentée et des altérations des structures internes *(Engel and Dale, 1968)*. Des inclusions paracristallines au sein de la matrice mitochondriale ont été observées ultérieurement *(Fernández et al., 1999; Lewandowska et al., 2008)*, de même que la présence d'inclusions de glycogène dans la matrice des mitochondries *(Raben et al., 2012)*. Ces altérations touchent non seulement la morphologie des mitochondries, mais également leur distribution et leur dynamique. Elles s'accompagnent d'une fragmentation accrue du réseau mitochondrial, d'une perte du potentiel de membrane mitochondriale, et d'une altération de la fonction bio-énergétique *(Lim et al., 2015)*.

Ce dysfonctionnement mitochondrial est souvent associé à une production excessive de ROS, induisant un stress oxydatif cellulaire *(Lim et al., 2014; Lim et al., 2015)*. Ce stress compromet l'intégrité des membranes mitochondriales et pourrait activer des voies de signalisation pro-apoptotiques. L'accumulation de glycogène au sein des lysosomes entraîne une surcharge lysosomiale et un blocage de l'autophagie, favorisant l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles. Il en résulte une 'élévation du stress oxydatif, une altération de la respiration ainsi qu'une réduction du potentiel membranaire

mitochondrial, aboutissant à une diminution de la production d'ATP et l'induction d'apoptose *(Lim et al., 2015)*.

Ce contexte crée un véritable cercle vicieux à l'origine de l'aggravation de la maladie de Pompe : surcharge lysosomiale, blocage de l'autophagie, dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydatif, activation de la mort cellulaire *(Zhang et al., 2024).*

IV.2.6. Imagerie et caractérisation des atteintes mitochondriales

En termes d'exploration en bio-imagerie, plusieurs approches ont été exploitées pour caractériser à différentes échelles les altérations mitochondriales dans la maladie de Pompe. La microscopie électronique reste l'outil de référence pour l'observation ultrastructurale des mitochondries. Elle a permis de mettre en évidence des anomalies morphologiques précoces telles qu'un gonflement mitochondrial, la présence d'inclusions paracristallines dans la matrice, ou encore des invaginations de la membrane interne *(Fernández et al., 1999; Lewandowska et al., 2008)*. Ces observations confirment un stress mitochondrial majeur, souvent corrélé à l'état avancé de la maladie.

Plus récemment, l'imagerie confocale a permis de visualiser de manière dynamique la distribution et la morphologie du réseau mitochondrial, aussi bien dans des modèles cellulaires que dans des fibres musculaires de souris cultivées *ex vivo*. Ces approches ont mis en évidence des phénomènes de fragmentation mitochondriale, une perte de connectivité du réseau, ainsi qu'une accumulation anormale de mitochondries à proximité des vacuoles autophagiques *(Lim et al., 2015)*. L'analyse du potentiel membranaire mitochondrial, réalisée à l'aide de sondes sensibles comme le JC-1 ou le TMRM, a révélé une perte de polarisation dans les zones de fibres altérées, traduisant une atteinte fonctionnelle des mitochondries *(Lim et al., 2015)*. Ces altérations morphologiques et fonctionnelles sont cohérentes avec les données biochimiques rapportant une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, accompagnée d'une production accrue de ROS.

Longtemps reléguée au 2nd plan, l'atteinte du réseau mitochondrial dans la maladie de Pompe n'a pas fait l'objet d'investigations approfondies. En dehors des observations ponctuelles en microscopie électronique et de l'étude pionnière menée par *Lim et al., (2015)* les dysfonctionnements mitochondriaux restent peu explorés. Pourtant, les données existantes soulignent clairement leur implication dans la progression de la maladie. À ce jour, les connaissances sur la dynamique temporelle de ces altérations, leur interaction avec les autres anomalies cellulaires (lysosomales, autophagosomales), ainsi que leur impact fonctionnel précis, demeurent fragmentaires. Par ailleurs, le spectre des atteintes pourrait varier en fonction du métabolisme des fibres musculaires. Des études plus systématiques, intégrant des approches multi-échelles, sont donc nécessaires pour mieux caractériser ces altérations mitochondriales et leur contribution au phénotype musculaire observé dans la maladie de Pompe.

À la lumière de ces éléments bibliographiques, les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans une démarche visant à explorer les altérations structurelles du muscle squelettique dans deux modèles de maladies : la DMD et la maladie de Pompe.

L'objectif principal a été de développer une approche d'imagerie 3D multimodale, permettant de caractériser simultanément le remodelage fibreux et le réseau vasculaire. Dans un 2nd temps, une approche d'imagerie super-résolution a été mise en œuvre afin de caractériser plus finement la morphologie et les atteintes organellaires dans le muscle Pompe.

Ce travail visait à établir un *workflow* complet, allant de la préparation des échantillons jusqu'à l'analyse quantitative, en intégrant des outils de segmentation et de traitement d'image basés sur le *deep learning*.

Les *pipelines* développés, adaptables à la variabilité biologique, ont été implémentés dans l'environnement Nikon (GA3), offrant des outils "clé en main" pour l'étude multi-échelle du muscle, depuis la structure tissulaire jusqu'à la morphologie subcellulaire.

La mise en œuvre d'une telle approche intégrée de bio-imagerie répond à la problématique scientifique de l'UMR 703, en permettant de relier les altérations du réseau collagénique et vasculaire à celles des organites intracellulaires (lysosomes, mitochondries). Elle vise ainsi à améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la DMD et à la maladie de Pompe, tout en ouvrant la voie à des applications quantitatives et translationnelles.

Résultats expérimentaux

V. Analyse 3D du remodelage vasculaire et fibrotique du muscle dystrophique

V.1. Positionnement du sujet

La DMD est caractérisée par un remodelage tissulaire progressif, marqué par le remplacement du tissu musculaire par des tissus fibreux et adipeux, ce qui entraîne une rigidification passive du muscle *(Brashear et al., 2022; Desguerre et al., 2009b)*. Des anomalies vasculaires, incluant une diminution de la densité capillaire et des altérations fonctionnelles, ont également été décrites. Ces perturbations contribuent à une hypovascularisation et à une ischémie fonctionnelle du muscle *(Nguyen et al., 2005; Mendell et al., 1971; Latroche et al., 2015).* Ces anomalies vasculaires sont corrélées à l'âge et à l'évolution de la maladie *(Podkalicka et al., 2021).* Toutefois, la majorité des travaux existants reposent sur des méthodes exploratoires en 2D. Bien que robustes et largement utilisées, ces approches ne permettent pas de décrire la complexité architecturale, la profondeur ni la sinuosité du réseau vasculaire. Par ailleurs, l'interaction entre l'accumulation de fibrose et son impact sur l'architecture vasculaire demeure peu documentée.

Une caractérisation exhaustive, globale et quantitative du réseau vasculaire et de la fibrose apparaît donc essentielle, d'autant plus que certaines stratégies thérapeutiques visant à stimuler la vascularisation ont montré une amélioration de la physiopathologie dans le modèle murin *mdx (Bosco et al., 2021; Verma et al., 2019)*.

Le modèle de rat DMD^{mdx} utilisé dans cette étude constitue un outil pertinent pour l'exploration de l'atteinte musculaire dans la DMD. En effet, ce modèle reproduit plusieurs des altérations observées chez les patients, telles que l'accumulation progressive de fibrose, l'anisocytose des fibres musculaires, ainsi que la dégénérescence et la régénération caractérisées par des fibres centronucléées *(Larcher et al., 2014)*. Ces caractéristiques en font un modèle adapté à l'étude des altérations vasculaires et à la caractérisation 3D de la vascularisation du muscle dystrophique, une approche qui reste à explorer. Pour mieux comprendre la nature et l'ampleur de ces atteintes, il est donc indispensable de développer une méthode d'analyse objective et quantitative.

Objectifs

Dans ce cadre, notre étude poursuit plusieurs objectifs complémentaires. Premièrement, nous avons cherché à développer une méthode de transparisation du muscle permettant d'augmenter la profondeur d'acquisition, jusqu'alors limitée à environ 200 µm dans les muscles pathologiques présentant des zones nécrosées. Deuxièmement, nous avons entrepris l'acquisition simultanée du collagène de type I, principal marqueur de fibrose, et du réseau vasculaire, à l'aide de la microscopie multiphotonique. Enfin, nous avons développé un *pipeline* d'analyse 3D destiné à extraire des informations quantitatives détaillées sur la fibrose, la vascularisation et leurs interactions spatiales.

V.2. Résumé de la démarche expérimentale

Pour mettre en œuvre cette approche, nous avons étudié le muscle *biceps fémoral* de rats sauvages (wild-type, WT) et DMD^{mdx} âgés de 12 mois. Le réseau vasculaire a été marqué à l'aide de la *Lycopersicon esculentum lectin* (LEL) couplée à la sonde Dylight 594, puis visualisé par microscopie multiphotonique. La méthode de transparisation combinait le protocole iDISCO+, favorisant une meilleure pénétration des sondes de lectin, et la méthode CUBIC, permettant de réduire le bruit de fond et l'autofluorescence. Le réseau vasculaire et la fibrose ont été imagés respectivement à partir de la fluorescence émise par la sonde Dylight584 et des signaux harmoniques générés par le collagène.

L'analyse des données a été réalisée à l'aide d'un *pipeline* dédié, intégrant des modèles de segmentation basés sur U-Net : i) un modèle pour segmenter les fibres musculaires en 3D, un autre modèle pour segmenter le réseau vasculaire.

V.3. Résumé des résultats

La démarche suivie a permis d'imager jusqu'à 1,5 mm de profondeur dans le tissu musculaire et d'extraire des caractéristiques 3D relatives à l'organisation du réseau vasculaire, du collagène ainsi que de leurs interactions dans un contexte dystrophique. Les analyses quantitatives ont mis en évidence plusieurs altérations majeures du réseau vasculaire dans le muscle dystrophique :

- Une désorganisation marquée du réseau vasculaire, caractérisée par une augmentation du facteur de partage et une densité de branchement accrue. Ces résultats sont en accord avec les observations précédemment décrites dans le modèle murin *mdx* âgé *(Latroche et al., 2015).* On observe par ailleurs une diminution du contact fibre-vaisseau, probablement en lien avec l'accumulation de la fibrose endomysiale rapportée *(Desguerre et al., 2009b).*
- Une accumulation de fibrose endomysiale, marqueur typique de la DMD, présentant des caractéristiques morphologiques distinctes du contrôle.

L'ensemble de ces résultats, détaillés dans l'article associé, apporte un éclairage sur l'organisation 3D du réseau vasculaire et sur ses interactions avec la fibrose dans le contexte de la DMD.

scientific reports

Check for updates

OPEN

Multiphoton microscopy and tissue clearing for 3D characterization of the vasculature and fbrosis remodeling in rat dystrophic skeletal muscle

Ibrahim Hassani[1,2], Mireille Ledevin[1], Chantal Thorin[1], Tony Fiore[2], Marie-Anne Colle[1], Karl Rouger[1,3]✉ & Laurence Dubreil[1,3]✉

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is characterized by progressive muscle fber degeneration and replacement by fbrous and adipose tissues, alongside signifcant vascular abnormalities. Traditional two-dimensional (2D) histological assessments provide limited insight into the complex three-dimensional (3D) spatial organization and structural disorganization within dystrophic muscle. Here, we present a novel 3D approach combining multiphoton microscopy (second harmonic generation [SHG] and two-photon excited fuorescence [TPEF]) with tissue-clearing methods to comprehensively characterize microvascular and connective tissue remodeling in dystrophic skeletal muscle. We established a dedicated 3D image analysis workfow utilizing deep-learning-based segmentation techniques to quantify key parameters in both vascular and fbrotic compartments in healthy and dystrophic rat muscle samples. Our fndings reveal a profound spatial reorganization of the vascular network in dystrophic muscle, marked by its embedding within an expanded connective tissue and a signifcant reduction in physical interactions with muscle fbers. This advanced imaging and analysis pipeline provides detailed insights into the extent of vascular and fbrotic remodeling in dystrophic muscle, and represents a powerful tool for monitoring disease progression and evaluating the efcacy of therapeutic interventions.

Keywords Muscular dystrophy, Vasculature, Fibrosis, Clearing, Multiphoton microscopy, Image analysis

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe X-linked recessive disorder caused by mutations in the dystrophin gene[1]leading to a complete lack of the dystrophin protein[2,3]. This deficiency destabilizes the plasma membrane, triggering repeated cycles of muscle fiber necrosis and degeneration, followed by their replacement with adipose and fibrotic tissue[4]. DMD patients exhibit muscle atrophy and progressive muscle weakness, resulting in loss of ambulation, and develop cardiomyopathy and respiratory insufficiency ultimately leading to premature death typically between 20 and 30 years of age[5,6].

Fibrosis, corresponding to the excessive deposition of fibrillar collagen types I and III from extracellular matrix[7]further impairs contractile muscle function and significantly contributes to disease progression[4,8]. In addition to muscle fiber degeneration, vascular abnormalities including impaired blood flow and reduced capillary density have been documented[9–11]. Interstitial fibrosis exacerbates vascular dysfunction by disrupting the structural integrity of the vascular network, leading to impaired nutrient and oxygen exchange with muscle fibers[4,10].

Fibrosis and vascular remodeling are typically assessed using conventional two-dimensional (2D) histological methods[4,12,13]. These methods provide limited insight into the complex 3D spatial relationships among muscle fibers, extracellular matrix, and vasculature. Nonlinear microscopy techniques, such as second harmonic generation (SHG) for label-free visualization of collagen-rich fibrotic structures[14] and two-photon excited fluorescence (TPEF) for high-resolution imaging of fluorescently labeled vasculature[15] can help address these limitations, enabling 3D imaging of thick tissues with intrinsic optical sectioning and reduced

[1]Oniris, INRAE, PAnTher, Nantes 44300, France. [2]Nikon Healthcare France, succursale Nikon Europe B.V., 94500 Champigny-sur-Marne, France. [3]Karl Rouger and Laurence Dubreil contributed equally to this work. ✉email: karl.rouger@inrae.fr; laurence.dubreil@inrae.fr

photobleaching[14,16,17]. However, even these advanced techniques are limited by light scattering in biological tissues[18,19]which restricts imaging depth to ~ 150 µm in uncleared muscle[20,21].

Tissue clearing methods can overcome this limitation by reducing light scattering through refractive index matching[22,23]rendering tissues optically transparent and significantly extending imaging depth[15,24]. When combined with multiphoton microscopy, tissue clearing enables high-resolution imaging at depths of up to 1 mm in organs such as the heart and brain[15,24]. However, in skeletal muscle, particularly in pathological conditions, imaging depth typically remains limited to approximately 350 µm due to higher scattering and tissue density[21]. Despite these advancements, few studies have systematically combined tissue clearing and multiphoton imaging to quantify and analyze the fibrotic-vascular interactions in dystrophic muscle.

In the present study, we developed a methodological pipeline that combines optical tissue clearing (iDISCO + [24] and CUBIC[25] protocols) with multiphoton microscopy to investigate the 3D remodeling of vasculature, stained with *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL), and connective tissue. Moreover, we implemented a deep learning-based image analysis workflow for the segmentation and quantification of vascular networks and muscle fibers. This approach was applied to skeletal muscles from 1-year-old healthy and dystrophic (DMD^{mdx}) rats to characterize morphological alterations in 3D and assess how fibrosis may contribute to impaired vascular organization.

Our results demonstrate that the combination of tissue clearing and multiphoton imaging provides a robust strategy to visualize and quantify 3D structural changes in dystrophic muscle. This method constitutes a novel tool for studying disease progression and evaluating therapeutic interventions targeting both vascular and fibrotic remodeling in neuromuscular disorders.

Results

Microvessels are small blood vessels located at the periphery of myofibers, including capillaries, terminal arterioles, and terminal venules[26,27].

Standard 2D histological analysis of dystrophic muscle reveals capillarization defects as a key feature of microvascular damage.

We first assessed vascular impairment in dystrophic muscle using a 2D approach. To this end, we analyzed two global parameters (microvessel-to-fiber ratio and microvessel density) and two specific metrics (microvessel contact and sharing factor), that are commonly employed to evaluate vasculature in skeletal muscle[28–30]. These analyses were conducted on *Biceps femoris* muscle sections from 1-year-old WT and DMD^{mdx} rats.

TPEF observation of transverse sections stained with LEL DyLight 594 revealed the distribution of microvessels within muscle fiber bundles, which were visualized by green autofluorescence (Fig. 1a, left panel). A binary mask was applied to the entire section to delineate the muscle fiber area (Fig. 1a, middle panel), enabling the isolation of endomysial vessels. These vessels were then automatically detected using the Segment.ai module in NIS-Elements software (Fig. 1a, right panel). This method revealed a microvessel-to-fiber ratio of 1.05 ± 0.08 in DMD^{mdx} rats and 1.5 ± 0.09 in WT rats (Fig. 1b, top). Although the ratio was numerically higher in WT rats, there was no significant difference between groups. Additionally, microvessel density, defined as the number of microvessels within the endomysial area, was measured as 268 ± 17 mm^{-2} in DMD^{mdx} rats and 243 ± 22 mm^{-2} in WT rats (Fig. 1b, bottom), indicating comparable microvessel densities between the two groups.

To investigate the interactions between microvessels and individual muscle fibers, we automated the measurements of microvessel contact and the sharing factor using the GA3 module in NIS-Elements software. Muscle fibers and microvessels were detected on 2D cross-sections using deep learning models, namely *SegmentObject.ai* and *Segment.ai*, respectively (Fig. 2a, left panel). Details of the training methodology are provided in the Materials and Methods section. To capture the spatial relationship more effectively, the binary mask representing microvessels was expanded to define a proximity area around each muscle fiber. A binary operation was then performed between the muscle fiber and microvessel masks to identify regions of proximity (Fig. 2a, right panel). These regions were used to uniquely associate each proximity region with a corresponding fiber and vessel, enabling precise quantification of microvessel-to-fiber interactions. While DMD^{mdx} rat muscle exhibited a numerical decrease in microvessel contacts per fiber compared to WT rats (3.2 ± 0.24 vs. 3.7 ± 0.17, respectively; Fig. 2b, top), this difference was not statistically significant. Conversely, DMD^{mdx} muscle was characterized by a significant increase in the sharing factor, which represents the number of fibers served by a single microvessel: 2.6 ± 0.07 (DMD^{mdx} rats) vs. 2.4 ± 0.03 (WT rats) ($p < 0.01$) (Fig. 2b, bottom). Collectively, these findings indicate altered microvasculature organization in 1-year-old DMD^{mdx} rats.

Multimodal 3D imaging reveals a newly formed vascular network and reduced muscle fiber-vessel interaction in dystrophic muscle.

To assess whether 3D imaging analysis could offer a more precise and comprehensive assessment of vascularization, focusing on vascular network connectivity and geometry, we utilized the same muscle samples as in previous experiments, but in thick section format. We optimized the clearing protocol for thick skeletal muscle, settling on a combination of the iDISCO + and CUBIC methods, as described previously[31]. We then validated that the staining with LEL DyLight 594 was compatible with this protocol. Following optimization, Z-stack images were generated from cleared and LEL DyLight 594-stained Sect. (1-mm-thick). Green muscle autofluorescence and red fluorescence of stained vessels were acquired with multiphotonic microscope up to a depth of 350 µm (Fig. 3a, first column). This enabled identification of muscle fiber bundles and the microvessel network in depth. We generated images with a high signal-to-noise ratio (SNR), which facilitated segmentation of the vasculature across the entire field of view (FOV, $1.052 \times 1.052 \times 0.350$ mm). Muscle fibers and microvessels segmented based on endogenous green fluorescence (Fig. 3a, second column) and red fluorescence (Fig. 3a, third column) staining, respectively, were color-coded to enhance their visibility. Vascular surfaces embedded

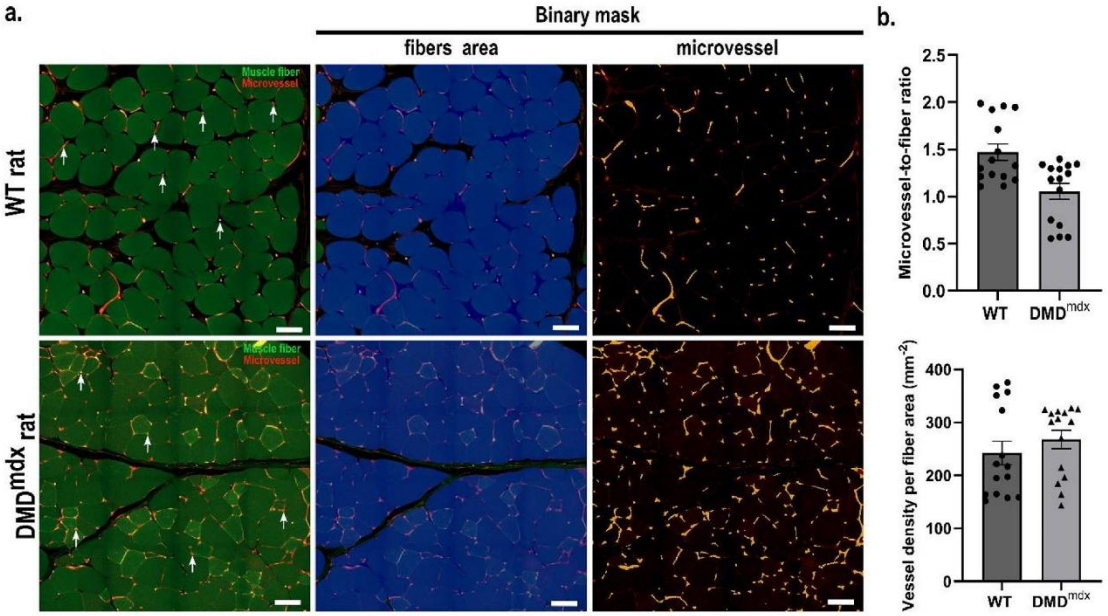


Fig. 1. Two-dimensional histomorphometric analysis of global vasculature in rat *Biceps femoris* muscle. Transverse sections from 1-year-old wild-type (WT) and dystrophic (DMD^{mdx}) rats were stained with *Lycopersicon esculentum* lectin-conjugated with Dylight 594 (LEL DyLight 594) and investigated with two-photon excited fluorescence (TPEF). (**a**) Left panel: muscle fibers and LEL DyLight 594-stained vessels (white arrows) are visualized by green autofluorescence and red fluorescence, respectively. Middle panel: binary mask (blue) highlights muscle fiber area used for isolating endomysial vessels. Right panel: LEL DyLight 594-stained vessels were detected using NIS-Elements software with the *Segment.ai* module (version 6.10.1, Nikon Europe BV, Amstelveen). Scale bar: 100 µm. (**b**) The microvessel-to-fiber ratio and vessel density per unit fiber area were determined in both rat groups from 3 WT and 3 DMD^{mdx} rats (15 regions per genotype). At least 100 fibers were analyzed per image. Statistical analysis was performed using a linear mixed-effects model in R (lme4 package). The normality of residuals was verified. No significant differences were observed between the two groups in capillary-to-fiber ratio ($p = 0.3$) or microvessel density ($p = 0.7$).

within muscle fibers were detected by applying an "AND" logical function between the binary masks of muscle fibers and vasculature (Fig. 3a; fourth column). We observed that the endomysial vascular network penetrating muscle consisted of branched capillaries that were well organized in WT rat muscle compared to the disorganized network in DMD^{mdx} rat muscle. Specifically, the vascular network was oriented parallel to the muscle fibers in WT rat muscle, but ran in multiple directions in DMD^{mdx} rat muscle.

For 3D quantitative analysis, we developed a pipeline within the GA3 module in NIS-Elements software, exploiting the same deep learning models used for the 2D analysis to detect objects. These models were applied to individual image slices, and the data were reconstructed into 3D volumetric representations. 3D microvessel density, expressed as the volume occupied by vessels relative to fiber volume, was higher in DMD^{mdx} (0.02 ± 0.002) versus WT rat muscle (0.014 ± 0.001) (Fig. 3b, left), although this difference was not statistically significant. However, the branching count per muscle fiber volume was significantly higher in DMD^{mdx} ($21{,}596 \pm 1{,}981$) versus WT ($13{,}428 \pm 2{,}094$) rats, indicating increased vascular network ramification in the dystrophic context ($p = 0.017$; Fig. 3b, middle). To facilitate efficient nutrient and oxygen exchange, capillaries form close contacts with muscle fibers by wrapping within grooves[32]. We assessed the embedding surface of the vasculature within muscle fibers, using muscle fiber and microvessel masks to calculate the shared surface area, which was then normalized to the number of fibers. Our analysis revealed a significant decrease in the contact surface area in DMD^{mdx} ($8.1 \pm 0.6\ \mu m^2$) versus WT ($20.4 \pm 3.1\ \mu m^2$) rats, indicating impaired vasculature-muscle interactions in dystrophic muscle ($p < 0.001$; Fig. 3b, right).

Additional morphometric analyses were conducted to assess the morphology of the vascular network. Vessel diameter and length were quantified using the filament algorithm in Imaris software (version 10.1, Oxford Instruments) (Fig. 4a). The algorithm's 'loops' function was trained on data from four distinct regions before being applied to analyze three images ($1.052 \times 1.052 \times 0.350$ µm) of both WT and DMD^{mdx} rat muscle. From each image, 150 microvessels were selected for analysis. The microvessel diameter was reduced in DMD^{mdx} (5.6 ± 0.1 µm) versus WT (5.9 ± 0.1 µm) rats ($p < 0.05$; Fig. 4b, top). Microvessel length was significantly shorter in the DMD^{mdx} (37.44 ± 1.3 µm) versus WT (54.218 ± 3 µm) muscle ($p < 0.0001$; Fig. 4b, bottom). Together, these results indicate a highly reorganized vasculature in dystrophic rat muscle, characterized by microvessels that are

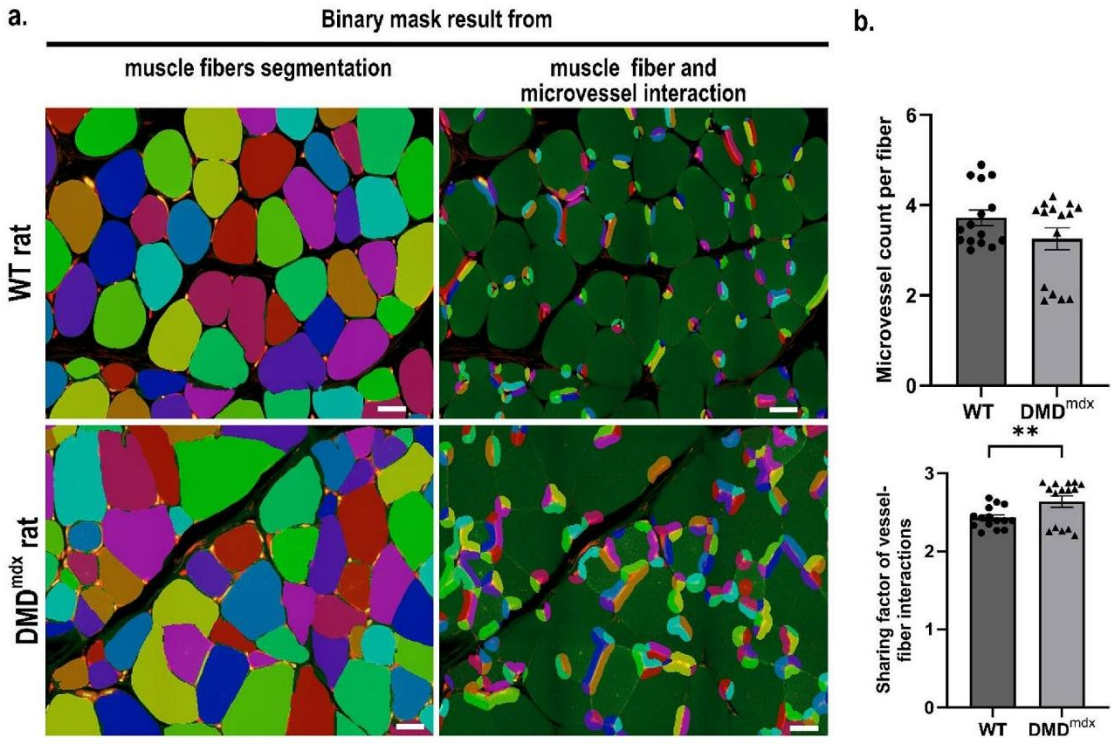


Fig. 2. Two-dimensional histomorphometric analysis of muscle fiber-associated vascular features in rat *Biceps femoris* muscle. Transverse sections from 1-year-old wild-type (WT) and dystrophic (DMD^{mdx}) rats were treated to define binary masks of muscle fibers and microvessels. (**a**) Left: muscle fibers and microvessels were segmented using the *SegmentObject.ai* module in NIS-Elements software (version 6.10.1, Nikon Europe BV, Amstelveen). Binary mask objects are false-colored to distinguish individual fibers. Right: binary mask between muscle fibers and microvessels were used to define capillary contacts. A proximity area, created by expanding the binary mask of vessels by 9 µm, identifies fibers in close contact with vessels, defining the fiber-to-vessel association. Scale bar: 50 µm. (**b**) The microvessel count per fiber and sharing factor (which quantifies the number of fibers supplied by a single microvessel) of vessel-fiber interactions were determined in both rat groups from 3 WT and 3 DMD^{mdx} rats (15 regions per genotype). Statistical analysis was performed using a linear mixed-effects model in R (lme4 package). The normality of residuals was verified.

more branched, shorter, wider, and exhibit reduced contact with muscle fibers. These findings underscore the utility of 3D multimodal exploration for analyzing spatially networked structures such as vasculature.

Multimodal 3D imaging enables combined assessment of microvascular and fbrotic remodeling in dystrophic muscle

Fibrosis represents one of the main pathological features of dystrophic muscle[4,33,34] and contributes to structural alterations in muscle bundle organization, including altered spatial relationships whereby the vascular network is detached from muscle fibers[12]. Recent evidence suggested that the disorganization of collagen network constitutes a potential biomarker of DMD[8,24]. Building on our microvasculature findings, we next sought to characterize the endomysial connective tissue in 3D and examine its interaction with the vascular network, allowing for a more comprehensive view of muscle remodeling at the structural level.

We analyzed forward 3D SHG on cleared muscle cross-sections. All images were acquired with consistent laser power, detector sensitivity, and gain settings. Image analysis of SHG collagen fibers was performed using the GA3 module of NIS-Elements Software, and false-coloring was applied to the binary mask. A substantial increase in collagen deposition was observed in DMD^{mdx} versus WT rats (Fig. 5a). Endomysial SHG density, corresponding to the volume of collagen network surrounding each muscle fiber relative to muscle fiber volume, was significantly higher in DMD^{mdx} (2.79% ± 0.10%) versus WT (0.51% ± 0.11%) muscle ($p < 0.0001$; Fig. 5b, left, top).

A detailed analysis of the collagen network was conducted by evaluating the morphology and spatial distribution of SHG^+ collagen objects. DMD^{mdx} rats exhibited overrepresentation across all volume classes, indicating increased collagen accumulation along the muscle fiber in depth (Fig. 5b, top right). SHG^+ collagen objects were more frequently distributed in shorter distance classes in DMD^{mdx} rats versus WT, suggesting a

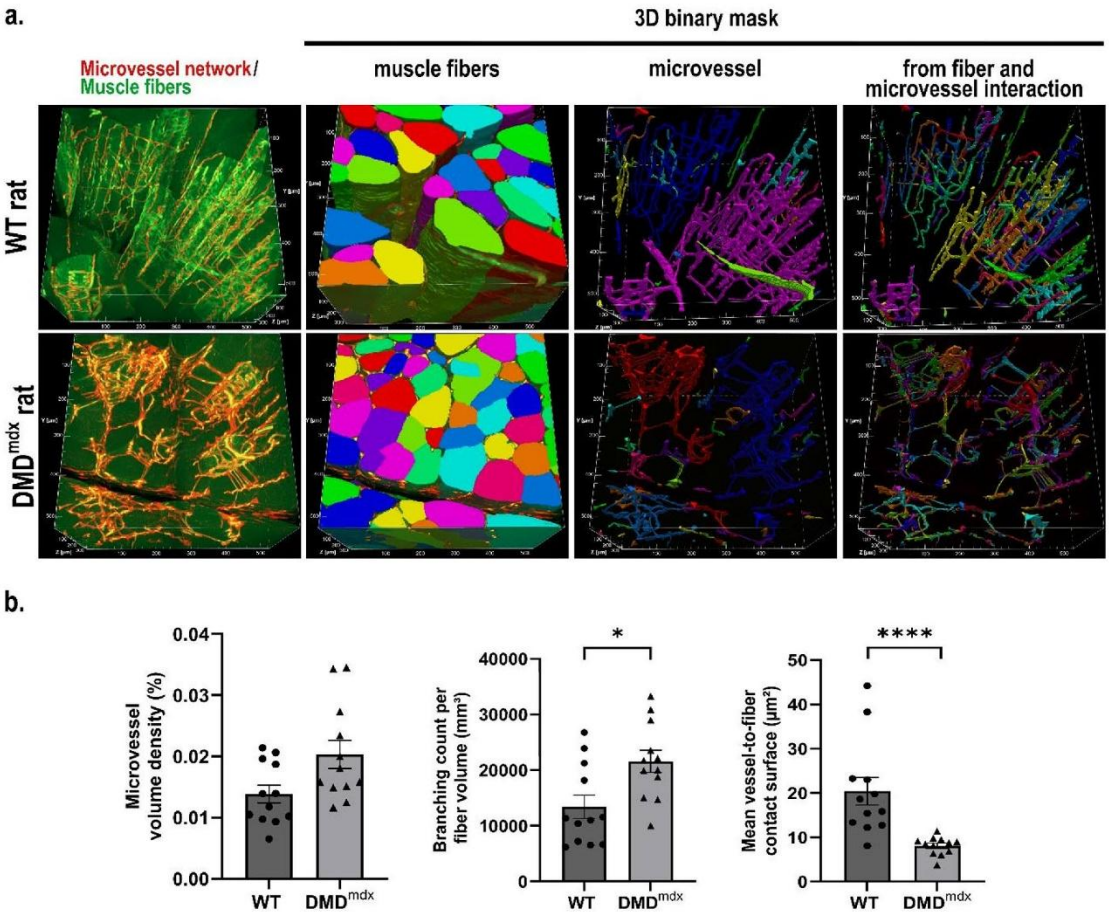


Fig. 3. Three-dimensional histomorphometric analysis of microvessels in rat *Biceps femoris* muscle. Transverse sections from 1-year-old wild-type (WT) and dystrophic (DMD^{mdx}) rats were subjected to iDISCO + and CUBIC clearing protocols, stained with *Lycopersicon esculentum* lectin-conjugated with Dylight 594 (LEL DyLight 594) and subsequently segmented for muscle fibers and the microvessel network. (**a**) From left to right: First column: visualization of muscle fibers (green autofluorescence) and vasculature (red; LEL-DyLight594). Second column: segmented muscle fibers were identified using the *SegmentObject.ai* module in NIS-Elements software (version 6.10.1, Nikon Europe BV, Amstelveen). Third column: segmented LEL-DyLight594-stained vascular network was generated using the *Segment.ai* module in NIS-Elements software. Fourth column: vasculature surface embedded within muscle fibers was detected by applying an "AND" logical function between the binary masks of muscle fibers and vasculature. Individual components are false-colored to distinguish each object. Field of view 1.052 × 1.052 × 0.350 mm. (**b**) the microvessel volume density, branching count per fiber volume and mean vessel-to-fiber contact surface were determined in both rat groups from 3 WT rats and from 3 DMD^{mdx} rats (12 regions per genotype). Statistical analysis was performed using a linear mixed-effects model in R (lme4 package) for volume density ($p = 0.06$). Since the residuals were not normally distributed within the model, a Wilcoxon test was used for the branching and vessel-to-fiber contact surface datasets. Significance levels were set as follows: $^{*}0.01 < p < 0.05$, $^{****}p < 0.0001$.

denser collagen network (Fig. 5b, bottom left). Moreover, these collagen objects were significantly less elongated in DMD^{mdx} versus WT rat muscle ($p < 0.001$; Fig. 5b, bottom right). Next, we identified 3D regions where DyLight594-stained microvessels spatially coincided with the SHG collagen network, using the previously generated binary masks of both structures (Fig. 6a). The volume of these overlapping regions was measured and normalized to the total microvessel volume to provide a quantitative assessment of the interaction between microvasculature and connective tissue (Fig. 6b, right). The volume of spatial overlap between microvessels and SHG collagen was 10.07 ± 1.66% in DMD^{mdx} rats and 1.79 ± 0.43% in WT rats ($p < 0.001$; Fig. 6b), indicating a significantly greater degree of microvessel embedding within the fibrotic network in dystrophic muscle. Overall,

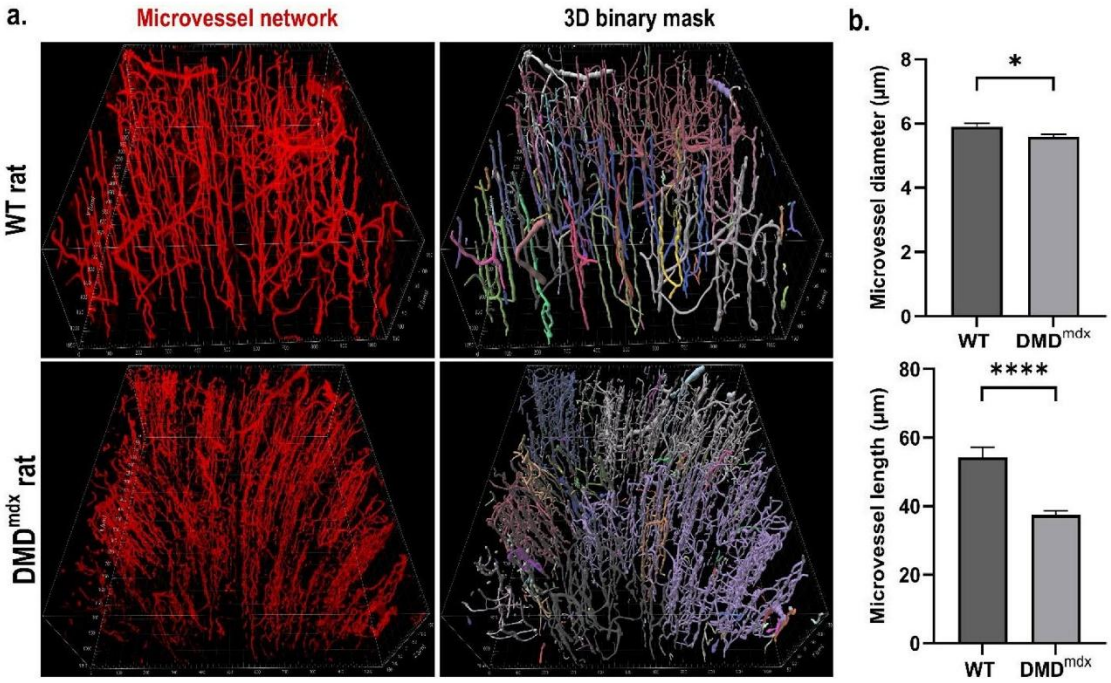


Fig. 4. Three-dimensional representations of the vasculature in the *Biceps femoris* muscle. Tissues were collected from 1-year-old wild-type (WT) and dystrophic (DMD^{mdx}) rats. (**a**) Left: 3D reconstruction of the vascular organization stained with *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL) DyLight 594 in $1.052 \times 1.052 \times 0.350$ mm³ images. Right: Top view of the vascular network, generated using a filament algorithm from Imaris software (version 10.1, Oxford Instruments), with false coloration applied to differentiate vascular structures within the binary mask. (**b**) Quantification of mean diameter and microvessel length. Each group consisted of 3 WT rats and 3 DMD^{mdx} rats. For each animal, 150 microvessels were analyzed. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test. $*0.01 < p < 0.05$, $****p < 0.0001$.

these data provide new information on the accumulation of connective tissue in dystrophic muscle, in terms of volume, concentration and shape, within which part of the microvasculature is embedded.

Discussion

In this study, we present compelling findings that underscore the utility of multimodal 3D imaging in elucidating the spatial organization and interactions between vasculature, muscle fibers, and connective tissue. Simultaneous 3D visualization of myofibers, microvessels, and/or connective tissue, followed by quantitative analysis on segmented objects, constitutes a powerful approach for comprehensively characterizing the extent of remodeling in dystrophic muscle.

Microvascular disruption is a pathological feature of muscular dystrophy[10,35,36] that adversely affects oxygen and nutrient delivery to muscle fibers and impedes muscle development[27]. As with fibrosis, vascular changes in dystrophic muscle are typically evaluated using conventional 2D histological analyses, which inherently offer limited spatial context[37]. In this study, we introduced a novel 3D approach to analyze the structure of the vasculature and collagen network, thereby providing further insight into their spatial organization within muscle bundles. To this end, we employed a multimodal imaging technique combining TPEF and SHG to investigate fluorescent lectin-stained vasculature and label-free SHG collagen on cleared rat dystrophic muscle, respectively. In contrast to previous studies that relied on conventional histological methods to assess vascular and fibrotic remodeling[4,34]our dual-modality imaging approach enabled simultaneous visualization of TPEF and SHG signals from both structures and analysis of their interactions within muscle fibers. Combined with iDISCO+and CUBIC clearing methods, this approach facilitated analysis of microvessel organization and collagen network connectivity to a depth of at least 1 mm (Supplementary Figure S1). We previously demonstrated the utility of tissue clearing and SHG imaging to study fibrosis in DMD^{mdx} rat heart using the CUBIC protocol[24]. Here, we combine CUBIC with iDISCO+to first enhance the penetration of the fluorescent probes for the vessels thanks to the organic solvent pretreatment in iDISCO+protocol and second to improve the tissue clearing and to avoid the tissue shrinkage thanks to hyperhydration pretreatment in CUBIC protocol. The combination of iDISCO+and CUBIC tissue clearing methods has previously been described for *in toto* imaging of whole ovarian follicles and their extrinsic vascular and neuronal networks[31].

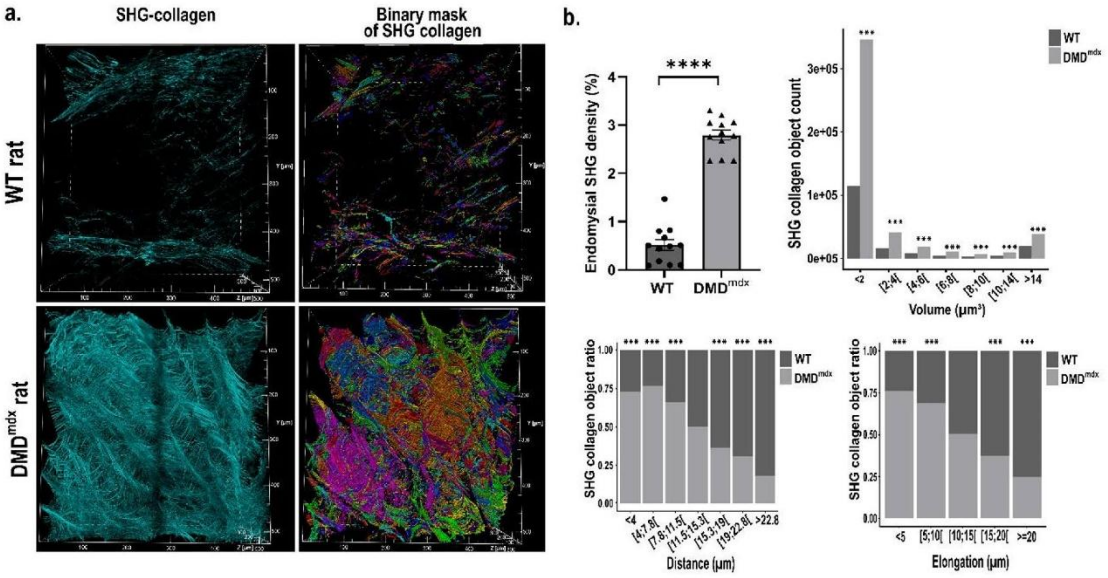


Fig. 5. Three-dimensional representation of SHG signal in rat *Biceps femoris* muscle. (**a**) Left: three-dimensional (3D) reconstruction of SHG collagen fibers in a 350 µm-thick muscle section from 1-year-old wild-type (WT) and dystrophic (DMD^{mdx}) rats (field of view $1.052 \times 1.052 \times 0.350$ mm³). The image was processed with a Laplacian of Gaussian filter to enhance fiber boundaries. Right: individual SHG collagen fibers were detected using the GA3 module in NIS-Elements software (Nikon Europe BV, Amstelveen, Netherlands), with false-coloring applied to the binary mask. (**b**) Bar graphs illustrate features characterizing endomysial SHG^+ objects: density, volume, distance separating objects and elongation of objects. Data were determined in both rat groups considering 3 animals per group and 4 regions each. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test for SHG density. For volume, distance, and elongation datasets, data were discretized into classes, and a log-linear model was applied to compare the distribution between groups. $^*0.01 < p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$.

In addition to this novel 3D imaging approach, we developed an image analysis protocol specifically designed to handle the inherent complexity of the objects being measured. Deep learning has emerged as a powerful tool alongside traditional hand-crafted analysis workflows, offering the potential for more accurate and efficient results[38]. Recent studies have demonstrated the effectiveness of deep learning U-net architecture to segment blood vessels in heart tissue sections, yielding accurate vascular morphometrics such as vessel length and density[38]. In our study, 3D features of the vasculature and collagen network were extracted using a U-Net model. We were able to measure vessel density, branching and sharing as well as to characterize the collagen network in terms of density packing and thickness/elongation, thereby corroborating the applicability of these tools as demonstrated by Lapierre-Landry and co-authors[38].

Recent studies have identified major structural and functional vascular network defects in a widely used model of DMD, the *mdx* mouse[10,13]. Alterations in flow capacity, vessel diameter, and vessel density increase in severity with age[10,38]. These findings emphasize the crucial role of vascular network damage in the pathophysiology of DMD. In the present study, we describe significant disruptions of the vascular network in the DMD^{mdx} rat model of DMD[39]. 2D analysis revealed an increased sharing factor in DMD^{mdx} versus WT rats, consistent with previous findings in *mdx* mice[10]. 3D analysis of the vasculature confirmed the presence of marked morphological alterations in dystrophic rat muscle, including increases in microvessel ramification, which may represent a compensatory response to the altered metabolic demands of dystrophic muscle[10,35]. In parallel, we observed decreased vessel-muscle fiber contact, which may indicate impaired functional interactions between the vascular network and muscle fibers. Similar vascular alterations were reported by Latroche et al. in 1-year-old *mdx* mice, in which the authors described significant increase in branching and functional impairments[10].

In analyzing fibrosis, 3D SHG imaging revealed significant changes in the morphology and distribution of the collagen network that were not detectable by 2D image analysis. Specifically, dystrophic rat muscle was characterized by thicker and more densely packed connective tissue. The architecture of collagen fibers has been linked with increased passive stiffness in fibrotic skeletal muscles in *mdx* mice[4,8]. Furthermore, there is a correlation between the amount of fibrotic tissue in *mdx* mouse muscle and contractile function. Given the more pronounced tissue phenotype in the DMD^{mdx} rat model than the *mdx* mouse[39]as well as the variability depending on the type of muscle considered, determining whether this correlation is also observed in DMD^{mdx} rats could help to better understand the contractile muscle properties.

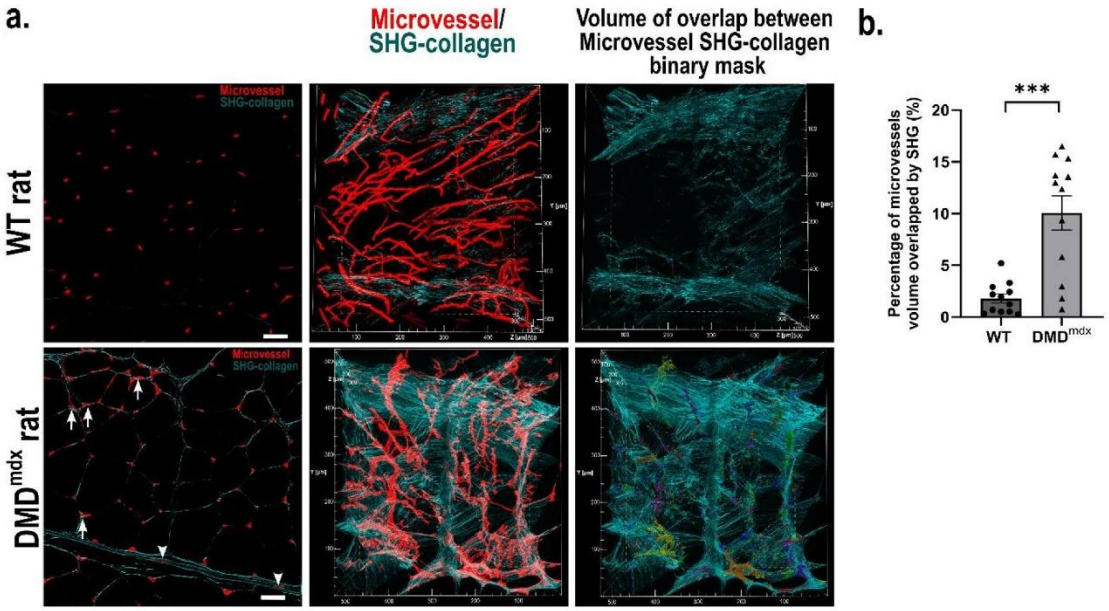


Fig. 6. Two and three-dimensional representations of vasculature and collagen network in the rat *Biceps femoris* muscle. Tissue sections from 1-year-old wild-type (WT) and dystrophic (DMD^{mdx}) rats were stained with *Lycopersicon esculentum* lectin-conjugated with Dylight594 (LEL DyLight594) and subjected to SHG. (**a**) DyLight594-stained vasculature and SHG collagen network were detected in thin tissue sections (left), thick tissue sections (middle) and alongside a binary mask highlighting the overlapped regions (right). Arrows indicate SHG collagen network encapsulating red-stained vessels. Overlapped regions are false-colored for clarity. (**b**) Microvessel volume overlapped by SHG was determined in both rat groups considering 3 animals per group (4 regions per rat). A Wilcoxon test was used for statistical analysis. *** $p < 0.001$.

3D SHG imaging revealed that the collagen network frequently encased vascular structures in dystrophic muscle, a phenomenon reported in DMD patients[4]. This encasing likely reflects a pathological interaction between fibrosis and vasculature. Excessive collagen deposition may restrict blood flow, contributing to the increased distance between capillaries and muscle fibers. These findings suggest a pathological feedback loop, whereby fibrosis exacerbates vascular pathology, which in turn drives further muscle degeneration.

The combined analysis of fibrosis and vascular alterations using SHG and TPEF imaging underscores the complex interplay between these two processes in DMD. Our findings suggest that therapeutic strategies targeting both the extension of the vascular network and fibrosis reduction could be effective in managing DMD. Enhancing vascular integrity could improve tissue perfusion and mitigate muscle damage, potentially alleviating some symptoms of the disease[40,41]. Concurrently, reducing fibrosis could restore the structural and functional integrity of the muscle[41]. Future studies should investigate the temporal dynamics of vascular and fibrotic remodeling in DMD to identify critical windows for intervention. Early therapeutic strategies targeting these processes could help slow or halt disease progression. Moreover, advanced imaging approaches such as those used in this study could be employed to evaluate the efficacy of potential therapies in preclinical and clinical settings.

Conclusion

The combination of multimodal 3D SHG/TPEF imaging with iDISCO + and CUBIC tissue clearing and deep learning-based image analysis provided new tools to get valuable insights into the structural and spatial features of microvessels and the collagen network in DMD. This approach is particularly well-suited to in-depth characterization of the extent of deterioration in the vasculature and collagen network. Using this approach, we demonstrated that dystrophic muscle features a spatially complex vascular network comprising small microvessels whose interactions with muscle fibers are limited by an encasing connective tissue. The quantitative 3D imaging technique described here could further our understanding of the natural progression of this disease, and serve as a useful tool to assess the impact of biotherapies on vascularization and fibrosis in preclinical studies on DMD.

Methods

Ethics statement and animal experiment

All experiments were carried out in accordance with the ARRIVE guidelines (https://arriveguidelines.org). The study was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the Pays de la Loire Region, France. All experiments were carried out in accordance with the French National Research Council guidelines for the care and use of laboratory animals (Permit number: APAFIS #39967-2022122112121987 v10). Wild-type (WT) and dystrophic (DMD^{mdx}) Sprague-Dawley rats were obtained from the transgenic rat immunophenomic platform (TRIP; Nantes, France). Three animals of each genotype, all aged 1 year, were included in this study. Animals were maintained in a controlled environment (temperature 21 ± 1 °C, 12-h light-dark cycle) at the Boisbonne Center for gene and cell therapy (Oniris, Nantes, France; agreement number: J44273). All efforts were made to minimize suffering. Rats were provided with environmental enrichment: provision of rolls is reported to potentially modify the behavior of housed animals and reduce chronic pain.

Tissue harvesting and sample collection

Anesthesia was induced with a mixture of ketamine (100 mg/kg, Imalgene, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany), after which the rats were euthanized by direct administration of sodium pentobarbital (Dolethal; Vetoquinol SA, Magny Vernois) into the vena cava previously accessed by laparotomy, at a lethal dose of 30–35 mg/kg. The *Biceps femoris* muscles were collected and separated into two portions: one was transferred to a tube containing 4% paraformaldehyde for fixation overnight at 4 °C and storage. The second was embedded in paraffin for classical histological analysis.

iDISCO + clearing pretreatment

Fixed muscles were cut into thick muscle Sect. ($6 \times 3 \times 1$ mm^3). After washing in PBS, sections were dehydrated stepwise in 20%, 40%, 60%, and 80% methanol (MeOH, 20846.292, VWR) / distilled water (dH_2O), with gentle shaking at room temperature (RT) for 1 h each. Tissue sections were then washed twice in 100% methanol (1 h, RT), followed by incubation in a 66% dichloromethane (DCM, 5895811000, Sigma-Aldrich) / 33% methanol solution overnight (ON) at RT. Tissue sections were rehydrated once again stepwise in 80%, 60%, 40%, and 20% MeOH/dH_2O with gentle shaking (1 h, RT) each. They were then washed twice with 0.2% Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich) in 1X PBS (1 h). Afterward, they were soaked (ON, 37 °C) in a permeabilization solution containing 0.2% Triton X-100, 20% dimethyl sulfoxide (DMSO, D4540, Sigma-Aldrich), 0.3 M glycine (G7126, Sigma-Aldrich), and 0.02% sodium azide (S2002, Sigma-Aldrich) in 1X PBS, with gentle shaking.

Vascular staining

Following iDISCO + clearing pretreatment, sections were incubated with *Lycopersicon esculentum* lectin conjugated with Dylight 594 (LEL DyLight 594, Invitrogen, L32471), diluted 1:50 in labeling solution (0.2% Tween 20, 10% DMSO, 0.02% sodium azide in 1X PBS) with gentle shaking (7 days, 37 °C). Next, sections were washed with 0.1% Tween 20 (P1379, Sigma-Aldrich) in 1X PBS (1 day) before proceeding with the clearing procedures.

iDISCO + clearing protocol

Stained sections were gradually dehydrated using the same procedure described above and were then incubated (ON, RT) in a solution of 66% dichloromethane (DCM) / 33% methanol (MeOH), washed twice in 100% DCM (20 min), and subsequently stored in dibenzyl ether (DBE, 108014, Sigma-Aldrich) at RT.

CUBIC clearing protocol

iDISCO + cleared sections were rehydrated stepwise in 80%, 60%, 40%, and 20% MeOH / dH_2O, with each step involving gentle shaking (RT, 1 h). Tissue sections were then washed three times with 1X PBS for 1 h each. Next, they were transferred to a 50% CUBIC-L (T3740, TCI) / 50% dH_2O solution (ON, 37 °C), followed by incubation with 100% CUBIC-L with gentle shaking (2 days, 37 °C). Following three washes with 1X PBS, sections were transferred to 50% CUBIC-R (T3741, TCI) (overnight, RT) and clarified a second time with CUBIC-R+ (T3741, TCI) (2 days, RT). Finally, sections were mounted with fibers oriented transversally on a cavity slide (Sigma-Aldrich, BR475565) using CUBIC-R+ (refractive index 1.52), and a 0.17 µm thick coverslip was placed on top before imaging.

Multiphoton microscopy imaging

Images were acquired using a laser scanning multiphoton microscope (A1R-MP+, Nikon Europe B.V., Amstelveen), coupled with a tunable laser (Insight DeepSee, Spectra Physics, France) operating in the wavelength range of 680–1300 nm, with a pulse duration of 120 femtoseconds at a repetition frequency of 80 MHz. A motorized half-wave plate (MKS-Newport, USA) was used to control the laser polarization angle, which was adjustable between 45° and 90°. The objective lens employed for imaging was a Plan-Apo Lambda S 25X silicon objective (refractive index 1.406, MRD73250, Nikon Europe B.V.), with a numerical aperture (NA) of 1.05 and a working distance (WD) of 0.55 mm. The microscope was equipped with eight non-descanned detectors (NDDs), four for backward detection and four for forward detection. Further details on the setup are provided in Fig. 7.

3D image acquisition

Excitation at 820 nm coupled with resonant scanning mode was used to acquire green autofluorescence from muscle fibers, red fluorescence from LEL DyLight 594-labeled vessels, and second harmonic generation (SHG) signals. Green autofluorescence and red fluorescence signals were collected in reflection using band-pass emission filters 525/50BP and 629/56BP for muscle fibers and vessels, respectively. SHG signals were collected in

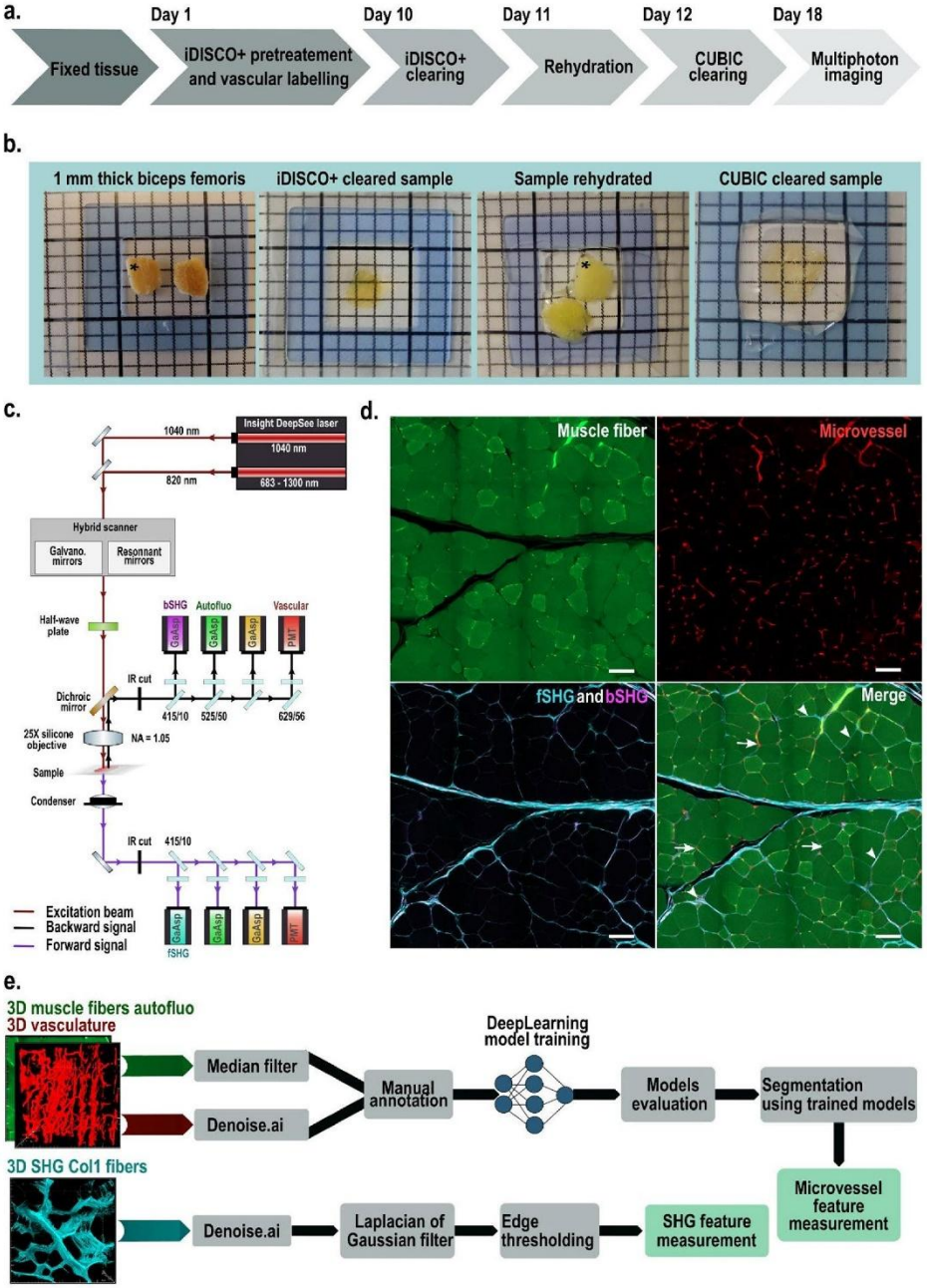


Fig. 7. Experimental workflow for muscle fiber autofluorescence, microvessel staining, SHG imaging and 3D analyses from cleared muscle samples. (**a**) Overview of the sample preparation steps, including iDISCO+/ CUBIC clearing protocols. (**b**) Representative images of the *Biceps femoris* muscle before and after the clearing protocols. (**c**) Multiphoton microscope setup for fluorescence and harmonic imaging. The configuration of emission filters is displayed above the GaAsP and PMT detectors. Excitation signals are shown in red, and emission signals in black and purple. (**d**) Representative images from DMD^{mdx} rat muscle. Top left: Muscle fibers visualized using green autofluorescence. Top right: *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL) DyLight 594-stained microvessels detected as red fluorescence. Bottom left: SHG imaging in both backward and forward directions from cleared sections. Bottom right: Merged autofluorescence, vascular staining, and SHG signals. White arrows indicate vessels, and white arrowheads highlight SHG signals. Scale bar: 100 µm. (**e**) Summary of the workflow applied to extract 3D features from cleared muscle samples.

Precision	Recall	F1	IoU
0.90	0.82	0.84	0.74

Table 1. Score metrics for *SegmentObject.ai* model trained.

Precision	Recall	F1	IoU
0.92	0.77	0.82	0,71

Table 2. Score metrics for *Segment.ai* model trained.

both reflection mode (bSHG) and transmission mode (fSHG) using short band-pass filters, 415/10BP. The field of view (FoV) was 297 µm x 297 µm, scanned at 1024 × 1024 pixels, resulting in a pixel size of 0.29 µm. Z-series were collected with a 1 µm step size within a 350 µm depth of the specimen. Tiles and depth scanning were performed to analyze at least 100 fibers, with the step size between tiles fixed at 1 µm. Images were generated as 12-bit ND2 files, and stitching and 3D reconstruction were performed using NIS-Elements software (version 5.20, Nikon Europe B.V).

Deep-learning model training.

Green autofluorescence from muscle fibers was segmented using the U-Net-based deep learning model "*SegmentObject.ai*" integrated into NIS-Elements software. This model is particularly suitable for segmenting muscle fibers due to its ability to separate densely packed objects. The training dataset comprised seven cropped images (400 × 400 × 10 µm), each containing annotations of 20 manually identified muscle fibers. The patch size was automatically set to 512 × 512. The training process consisted of a minimum of 2,500 epochs across three batches and was conducted on an NVIDIA RTX5000 graphics unit (Driver version 516.40, NVIDIA). The trained model was applied on another dataset comprising eight manually annotated images for validation. The following metrics were measured (details are provided on Supplementary Figure S2 and S3):

- - Precision: Evaluates the fraction of correctly predicted positive regions out of all predicted positive regions.
- - Recall: Also known as sensitivity or True Positive Rate, measures how many of the true positive regions were correctly identified.
- - F1 score: Harmonic mean of Precision and Recall.
- - Interception Over Union (IoU): Also known as the Jaccard Index, measures the overlap between the predicted segmentation and the ground truth.

The LEL-DyLight594-labeled vasculature was segmented using the "*Segment.ai*" in NIS-Elements software. The training dataset included three images (200 × 200 × 300 µm) with a patch size automatically set to 256 × 256 pixels. Initial identification of vasculature structures was achieved through thresholding, followed by manual refinement to create accurate binary masks, which served as the ground truth for model training. The model underwent two separate training runs, each consisting of 500 epochs. To validate the vascular segmentation, the same approach previously employed for validating muscle fiber segmentation was applied.

Both segmentation models demonstrated high accuracy (*SegmentObject.ai* in Table 1, *Segment.ai* in Table 2, with detailed measurements provided in Supplementary Tables S1 and S2), with minimal false positives (precision was 0.90 and 0.92 for the muscle fiber model and the microvessel model, respectively). However, some false negatives were observed, as indicated by recall values of 0.82 and 0.77 for the respective models. The Intersection over Union (IoU) score was 0.74 and 0.71 for the muscle fiber and microvessel models, respectively, while the F1-scores were 0.84 and 0.82, further supporting the robustness of the segmentation performance.

Image analysis of the vasculature

Two-dimensional images: Vascularization was evaluated on five regions per animal ($n = 6$ rats), each measuring 1052 × 1052 µm, using the General Analysis 3 (GA3) module in NIS-Elements software (version 6.10.1, Nikon Europe BV, Amstelveen). Vessels were detected using the trained "*Segment.ai*" model, which was imported into the GA3 module. The GA3 pipeline (details are provided in Supplementary Figure S4) was then applied to 30 regions ($n = 15$ from 3 WT rats and 15 from 3 DMD^{mdx} rats) to analyze the vascular structures. For feature extraction, only endomysial vessels were considered by applying the binary mask of muscle fibers. Vessel-to-fiber ratio was determined by dividing the total number of vessels by the total number of fibers. Vessel density was calculated by dividing the number of vessels by the muscle fiber area. Vessel count per fiber and sharing factor were determined by performing a binary operation between muscle fibers and microvessels. To this end, a proximity area was created by expanding the binary mask of vessels by 10 µm in order to identify fibers in close contact with vessels, defining the fiber-to-vessel association.

Three-dimensional images: Vascularization was evaluated on four regions per animal ($n = 6$ rats), each measuring 526 × 526 × 350 µm, using the GA3 module. The vascular network was detected using the "*Segment.ai*" model imported into the GA3 pipeline (see Supplementary Figure S5 for additional details) and applied to 24 regions ($n = 12$ from 3 WT rats and 3 DMD^{mdx} rats). This enabled the extraction of key features: vascular network density, vascular branching, and surface area of vessels embedded within muscle fibers. The extracted data were exported for statistical analysis.

Three-dimensional image analysis of the collagen network

Connective tissue remodeling was evaluated through analysis of SHG endomysial collagen network on four regions of interest (ROIs) per animal ($n = 6$, rats), each measuring $526 \times 526 \times 350$ µm. 3D rendering and image analysis were performed using the General Analysis 3 (GA3) module in NIS-Elements software (version 6.10.1, Nikon Europe B.V.). A pre-trained deep learning denoising algorithm was applied to the SHG collagen fiber signal to remove shot noise. Subsequently, a spatial "Laplacian of Gaussian" (LoG) filter (Gaussian $\sigma = 2.7$, kernel size $= 5 \times 5$) was applied to identify SHG collagen network boundaries. A manual threshold based on edge detection was used for segmenting the SHG^+ objects. Muscle fibers were segmented using the previously trained deep learning model specifically designed for muscle fiber segmentation. To restrict the analysis to SHG collagen network in the endomysial region, the segmented binary mask of autofluorescent muscle fibers was expanded by a 3 µm kernel diameter. A logical "AND" operator was then applied between the binary masks of muscle fibers and SHG collagen network. The resulting SHG collagen network binary masks in the endomysial region were used to extract features of interest: density, volume, elongation and inter-fiber distance of SHG^+ objects, overlapping surface between collagen network and vessels. The GA3 pipeline is described in detail in Supplementary Figure S6.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (version 4.4.1). Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were conducted using a linear mixed-effects model, with random effects on muscle, implemented in the lme4 package. All models presented in this study were assessed for independence and normality of residuals, as recommended. For datasets that did not meet these assumptions, a Wilcoxon test was used instead. For SHG dataset, loglinear models were used to compare the distribution of measures previously discretized into classes. Significance was set at $p < 0.05$ for all statistical tests.

Data availability

No datasets were generated or analysed during the current study.

Received: 4 March 2025; Accepted: 15 September 2025

References

1. Bushby, K. M. D. Genetic and clinical correlations of Xp21 muscular dystrophy. *J. Inher Metab. Disea.* **15**, 551–564 (1992).
2. Hoffman, E. P., Brown, R. H., Kunkel, L. M. & Dystrophin the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. (1987).
3. Bonilla, E. et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* **54**, 447–452 (1988).
4. Desguerre, I. et al. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: A marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 762–773 (2009).
5. Kohler, M. et al. Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **80**, 320–325 (2009).
6. Mazur, W. et al. Patterns of left ventricular remodeling in patients with Duchenne muscular dystrophy: a cardiac MRI study of ventricular geometry, global function, and strain. *Int. J. Cardiovasc. Imaging.* **28**, 99–107 (2012).
7. Gillies, A. R. & Lieber, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve.* **44**, 318–331 (2011).
8. Brashear, S. E. et al. Collagen cross-links scale with passive stiffness in dystrophic mouse muscles, but are not altered with administration of a Lysyl oxidase inhibitor. *PLoS ONE.* **17**, e0271776 (2022).
9. Loufrani, L. et al. Flow (Shear Stress)–Induced Endothelium-Dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation* **103**, 864–870 (2001).
10. Latroche, C. et al. Structural and functional alterations of skeletal muscle microvasculature in Dystrophin-Deficient Mdx mice. *Am. J. Pathol.* **185**, 2482–2494 (2015).
11. Kodippili, K., Thorne, P. K., Laughlin, M. H. & Duan, D. Dystrophin deficiency impairs vascular structure and function in the canine model of Duchenne muscular dystrophy. *J. Pathol.* **254**, 589–605 (2021).
12. Nguyen, F., Guigand, L., Goubault-Leroux, I., Wyers, M. & Cherel, Y. Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 154–163 (2005).
13. Loufrani, L. et al. Absence of dystrophin in mice reduces NO-Dependent vascular function and vascular density: total recovery after a treatment with the aminoglycoside gentamicin. *ATVB* **24**, 671–676 (2004).
14. Strupler, M. et al. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Opt. Express.* **15**, 4054 (2007).
15. Lagerweij, T. et al. Optical clearing and fluorescence deep-tissue imaging for 3D quantitative analysis of the brain tumor microenvironment. *Angiogenesis* **20**, 533–546 (2017).
16. Fuentes-Corona, C. G. et al. Second harmonic generation signal from type I collagen fibers grown in vitro. *Biomed. Opt. Express.* **10**, 6449 (2019).
17. Aghigh, A. et al. Second harmonic generation microscopy: a powerful tool for bio-imaging. *Biophys. Rev.* **15**, 43–70 (2023).
18. Clarke, R. J. & Oprysa, A. Fluorescence and light scattering. *J. Chem. Educ.* **81**, 705 (2004).
19. Schwertner, M., Booth, M. J. & Wilson, T. Specimen-induced distortions in light microscopy. *J. Microsc.* **228**, 97–102 (2007).
20. Rothstein, E. C., Carroll, S., Combs, C. A., Jobsis, P. D. & Balaban, R. S. Skeletal muscle NAD(P)H Two-Photon fluorescence microscopy in vivo: topology and optical inner filters. *Biophys. J.* **88**, 2165–2176 (2005).
21. Schneidereit, D. et al. An advanced optical clearing protocol allows label-free detection of tissue necrosis *via* multiphoton microscopy in injured whole muscle. *Theranostics* **11**, 2876–2891 (2021).
22. Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. *Clarifying Tissue Clearing Cell* **162**, 246–257 (2015).
23. Renier, N. et al. A simple, rapid method to Immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014). iDISCO.
24. Pichon, J. et al. Label-free 3D characterization of cardiac fibrosis in muscular dystrophy using SHG imaging of cleared tissue. *Biol. Cell.*. **114**, 91–103 (2022).
25. Susaki, E. A. et al. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat. Protoc.* **10**, 1709–1727 (2015).
26. Granger, D. N. & Senchenkova, E. *Inflammation and the Microcirculation.* **2** (2010).
27. Latroche, C. et al. Skeletal muscle microvasculature: A highly dynamic lifeline. *Physiology* **30**, 417–427 (2015).
28. Hudlická, O. Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. *Circ. Res.* **50**, 451–461 (1982).

29. Deveci, D., Marshall, J. M. & Egginton, S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**, H241–H252 (2001).
30. Nederveen, J. P., Betz, M. W., Snijders, T. & Parise, G. The importance of muscle capillarization for optimizing satellite cell plasticity. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **49**, 284–290 (2021).
31. McKey, J., Cameron, L. A., Lewis, D., Batchvarov, I. S. & Capel, B. Combined iDISCO and CUBIC tissue clearing and lightsheet microscopy for in Toto analysis of the adult mouse ovary†. *Biol. Reprod.* **102**, 1080–1089 (2020).
32. Glancy, B. et al. In vivo microscopy reveals extensive embedding of capillaries within the sarcolemma of skeletal muscle fibers. *Microcirculation* **21**, 131–147 (2014).
33. Kharraz, Y., Guerra, J., Pessina, P. & Serrano, A. L. Muñoz-Cánoves, P. Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 1–11 (2014).
34. Giovarelli, M. et al. Characterisation of progressive skeletal muscle fibrosis in the Mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy: an in vivo and in vitro study. *IJMS* **23**, 8735 (2022).
35. Podkalicka, P. et al. Age-Dependent dysregulation of muscle vasculature and blood flow recovery after hindlimb ischemia in the Mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Biomedicines* **9**, 481 (2021).
36. Podkalicka, P., Mucha, O., Dulak, J. & Loboda, A. Targeting angiogenesis in Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 1507–1528 (2019).
37. Lattouf, R. et al. Picrosirius red staining: A useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 751–758 (2014).
38. Lapierre-Landry, M., Liu, Y., Bayat, M., Wilson, D. L. & Jenkins, M. W. Digital labeling for 3D histology: segmenting blood vessels without a vascular contrast agent using deep learning. *Biomed. Opt. Express.* **14**, 2416 (2023).
39. Larcher, T. et al. Characterization of dystrophin deficient rats: A new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE.* **9**, e110371 (2014).
40. Verma, M. et al. Inhibition of FLT1 ameliorates muscular dystrophy phenotype by increased vasculature in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS Genet.* **15**, e1008468 (2019).
41. Bosco, J. et al. VEGFR-1/Flt-1 Inhibition increases angiogenesis and improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Therapy - Methods Clin. Dev.* **21**, 369–381 (2021).

Acknowledgements
We thank the staff of the Boisbonne Center (Oniris, Nantes, France) for animal care and the APEX platform (INRAE/Oniris, Center of Excellence Nikon Nantes [CENN], Nantes, France) from UMR 0703 PAnTher (INRAE/Oniris, Nantes, France) for their valuable technological support. We also extend our gratitude to the FAIR CHARM consortium (H2020 program, in which UMR 703 PAnTher is a partner) for fostering a collaborative scientific environment through discussions and the sharing of biological materials. We gratefully acknowledge financial support from Région Pays de la Loire and NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences , "Investissement d'Avenir-ANR-11-INBS-0011". The authors also thank Biogenouest (the network of technology core facilities in Western France in life sciences and the environment, supported by the Conseil Régional des Pays de la Loire) for supporting APEX.

Author contributions
I.H. conceived, designed, and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. M.L. assisted with sample clearing. C.T. performed statistical analysis, reviewed, and edited the manuscript. T.F. supervised the study, assisted with data acquisition, and reviewed and edited the manuscript. M.A.C. supervised the study, reviewed, and edited the manuscript. K.R. supervised the study, contributed to data interpretation, and participated in manuscript writing. L.D. supervised the study, conceived and designed the experiments, contributed to data interpretation, and participated in manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Declarations

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-025-20335-9.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.R. or L.D.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/.

© The Author(s) 2025

Supplementary data

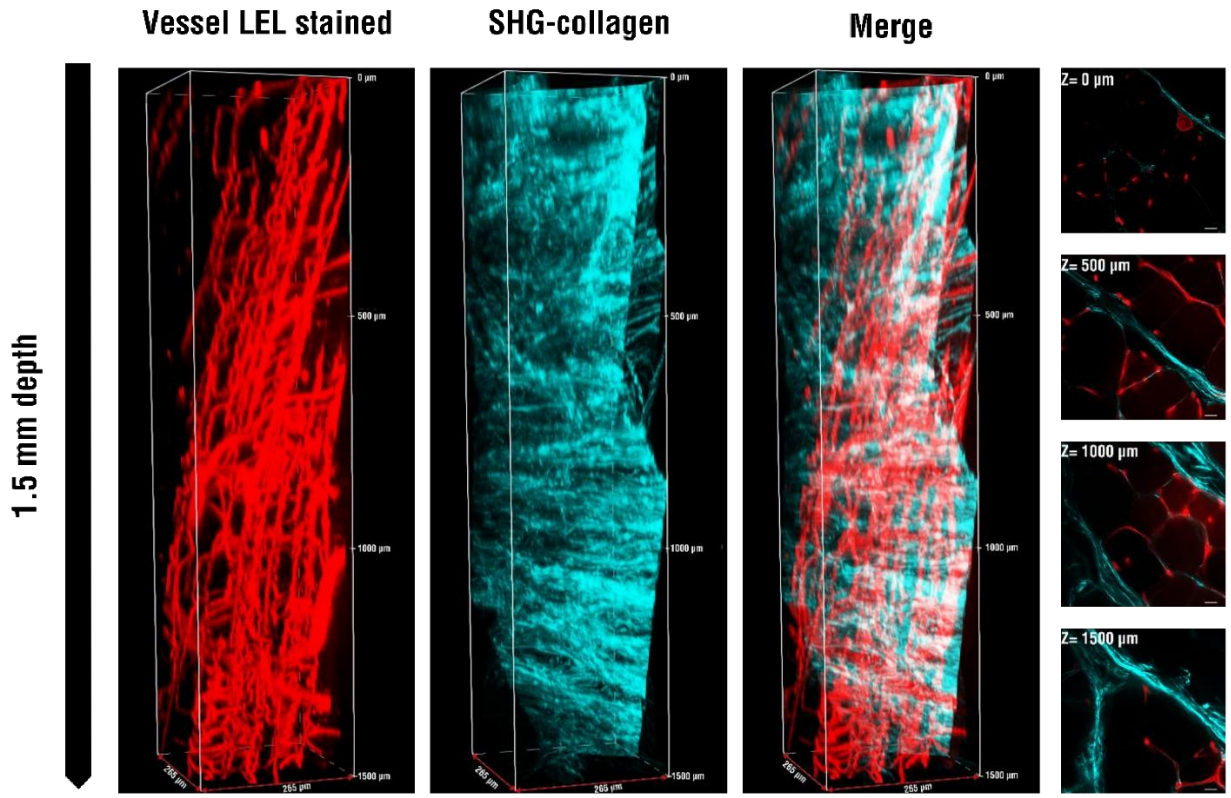


Figure S1: Three-dimensional visualization of microvessels and SHG-collagen in iDISCO+/CUBIC-cleared *Biceps femoris* muscle from 1-year-old dystrophic (DMD^{mdx}) rat (0.265×0.265×1.5 mm^3). From left to right: 3D representation of vasculature (red; LEL-DyLight594), SHG-collagen signal, merged view, and selected 2D Z-slices at depths of 0, 500, 1000, and 1500 µm. The image demonstrates successful acquisition throughout the depth, up to 1500 µm, using the combined clearing protocol.

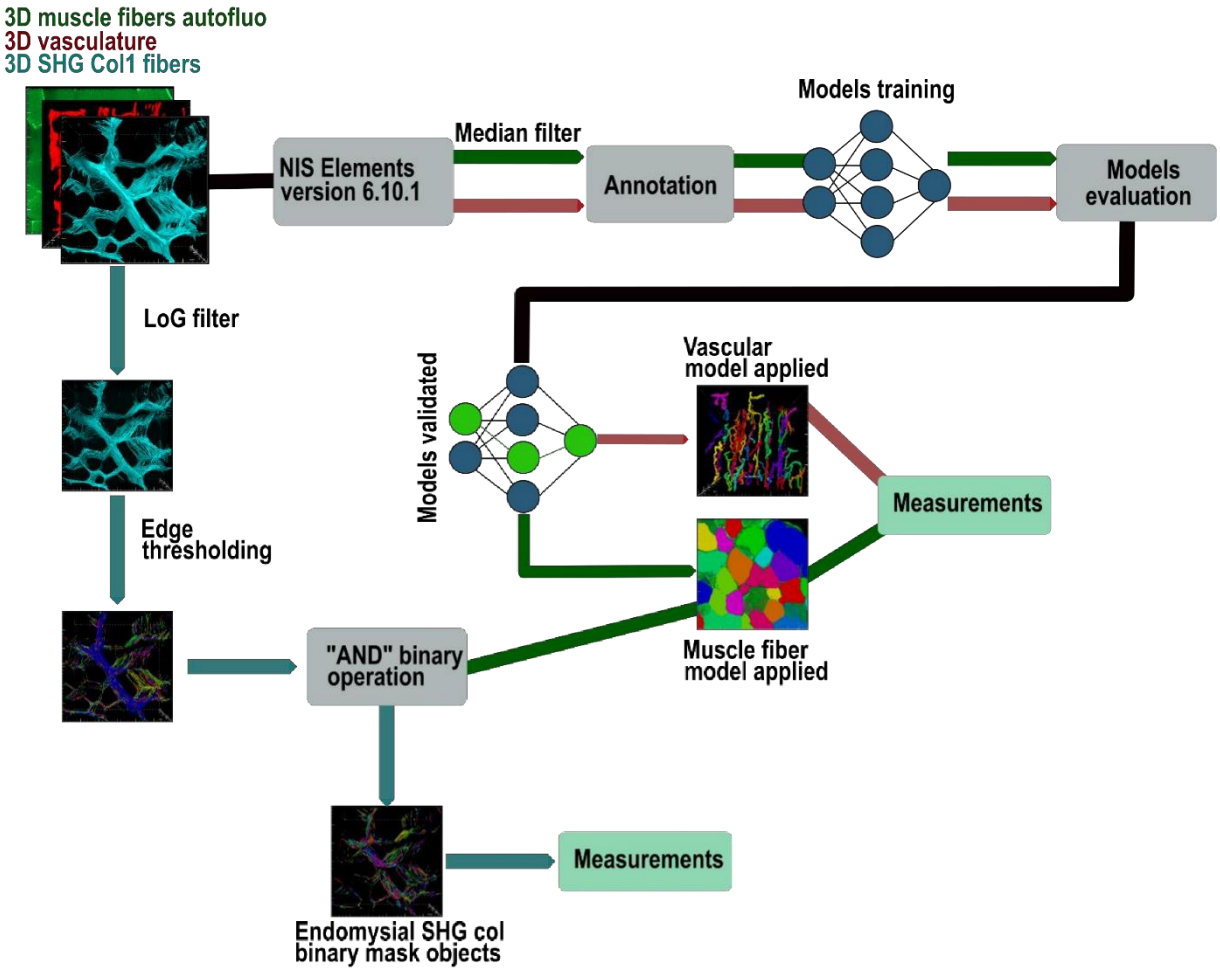


Figure S2: Image processing workflow for vasculature and fibrosis analysis. A step-by-step workflow was implemented for the analysis of vasculature and fibrosis in dystrophic muscle.

Preprocessing. A median filter with a kernel size of 3 × 3 was applied to green autofluorescence images of muscle fibers to reduce pepper noise and enhance muscle boundaries.

Annotation and training. Muscle fibers: Seven cropped images (400 × 400 × 10 µm) containing 20 fibers each were annotated manually using NIS-Elements software (version 6.10.1, Nikon Europe BV).

Vessels: Three cropped images (200 × 200 × 300 µm) were manually annotated.

Segmentation Models. Muscle fibers: The "*SegmentObject.ai*" model, specifically designed for densely packed structures, was used. This model includes a step for separating contiguous objects. Vessels: The "*Segment.ai*" model was used.

Training details. Training for muscle fibers included three rounds of at least 2,500 epochs. Training for vessels consisted of two sessions of 500 epochs.

All trainings were conducted on an HP Z4 workstation equipped with an NVIDIA RTX5000 graphics unit (Driver version 516.40, NVIDIA).

Validation. The models were validated on eight test images for both muscle fibers and vessels. Performance metrics, including loss function, precision, recall, F1-score, and Intersection Over Union (IoU), were calculated.

$$Precision = \frac{|True\ Positive|}{True\ Positive + False\ Positive}$$

$$Recall = \frac{|True\ Positive|}{|True\ Positive + False\ Negative|}$$

$$F1\ score = \frac{2 * |Precision * Recall|}{|Precision + Recall|}$$

$$IoU = \frac{|Prediction\ \cap Ground\ Truth\ |}{|Prediction\ \cup Ground\ Truth| - |Prediction \cap GroundTruth|}$$

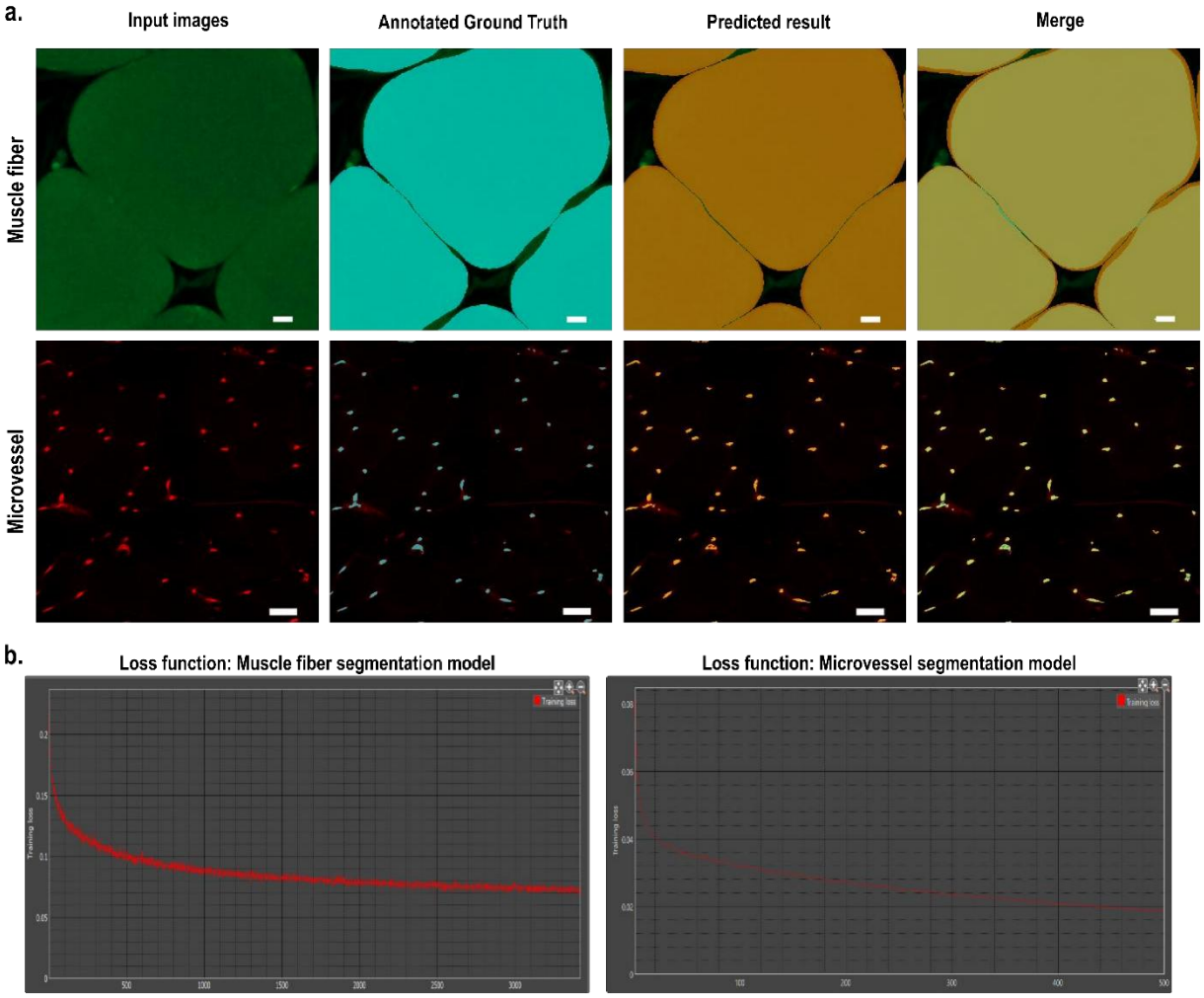


Figure S3: (a) Cropped images illustrate the effectiveness of the predictions made by the deep learning models for muscle fibers and microvessels. The segmented outputs demonstrate high fidelity in accurately identifying and delineating these structures from the input data. Scale bar: 10 μm for muscle fibers; 50 μm for microvessels. (b) The loss functions of both models are shown as a result of the training process. The x-axis represents the iteration steps, while the y-axis represents the corresponding loss values. The progressive reduction in the loss function during training indicates convergence and improved model performance over time.

Table S1: Metrics evaluated for microvessel model segmentation for eight images

Precision	Recall	F1	IoU
0,818613	0,928172	0,869957	0,769844
0,875018	0,932336	0,902769	0,822769
0,878735	0,899686	0,889087	0,800321
0,989785	0,581503	0,7326	0,578033
0,973131	0,748988	0,846473	0,733813
0,98126	0,60289	0,746889	0,596027
0,98126	0,60289	0,746889	0,596027
0,864182	0,87377	0,86895	0,768268

Table S2: Metrics evaluated for muscle fibers model segmentation for eight images

Precision	Recall	F1	IoU
0,953489	0,999011	0,975719	0,95259
0,875018	0,932336	0,902769	0,822769
0,878735	0,899686	0,889087	0,800321
0,864182	0,87377	0,86895	0,768268
0,973131	0,748988	0,846473	0,733813
0,98126	0,60289	0,746889	0,596027
0,664947	0,95938	0,785479	0,646739
0,989785	0,581503	0,7326	0,578033

Analysis and Feature Extraction: The trained models were applied for automated segmentation, followed by feature measurements of interest, such as vessel morphology and fiber-vessel interactions.

SHG-Collagen analysis. A denoising algorithm, "*Denoise.ai*" was applied followed by a Laplacian of Gaussian (LoG) filter with a sigma (σ) value of 2.7 to enhance SHG-collagen fiber boundaries.

$$LoG\,(x,y) = -\frac{1}{\pi\sigma^4}\left(1-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}\right) e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$$

$\boldsymbol{\sigma}$: The standard deviation of the Gaussian function, which controls the amount of smoothing.

$(\boldsymbol{x}, \boldsymbol{y})$: Spatial coordinates in the image.

Laplacian term $\left(\mathbf{1} - \frac{\boldsymbol{x}^2+\boldsymbol{y}^2}{2\boldsymbol{\sigma}^2}\right)$ which computes the second derivative.

Edge thresholding was then used to detect SHG-collagen structures. Endomysial SHG-collagen structures were selected by applying a binary operation between SHG-collagen objects and muscle fiber masks, enabling quantification of relevant features.

General analysis pipeline.

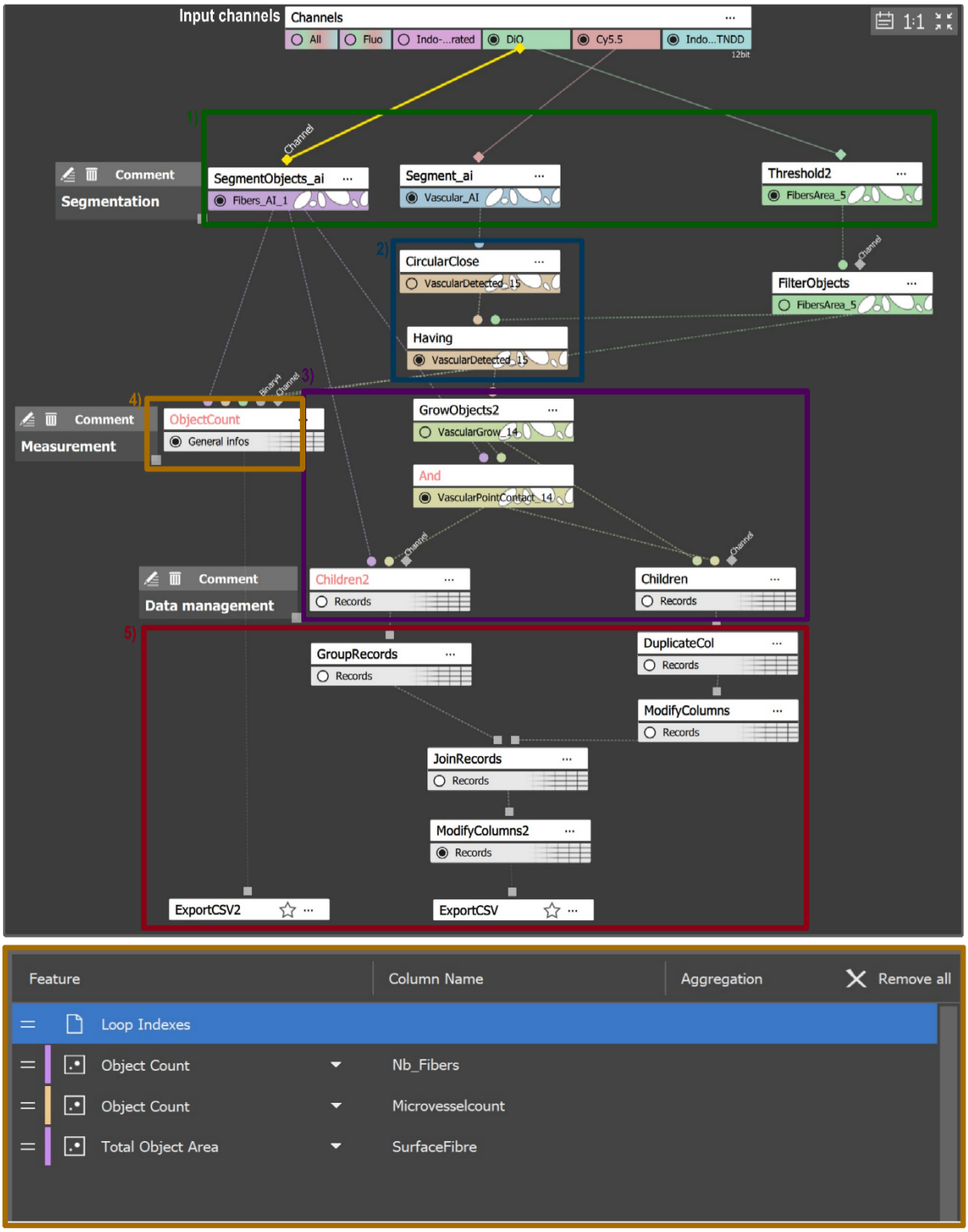


Figure S4: General Analysis 3 (GA3) Pipeline for 2D vasculature and muscle fiber feature extraction. The GA3 pipeline was developed to extract features related to vasculature and muscle fibers from 2D images, integrating deep learning segmentation and binary operations to quantify interactions between these structures.

1. **Input and segmentation (Green Section):**
    - The pipeline begins by applying two U-Net-based deep learning models: one for segmenting green autofluorescent muscle fibers and the other for segmenting vasculature from the input channels.
    - The muscle fiber area was selected using manual thresholding. Since the entire area was needed, specific thresholding techniques were not required.
2. **Muscle fiber and vasculature measurement (Blue and Orange section):**
    - A binary operation, “Having,” was applied to isolate vasculature contained within the muscle fiber area.
    - Measurements were then conducted, including the number of fibers, number of microvessels, and the total muscle fiber surface area.
    - These data were subsequently used to calculate:
        - **Microvessel density** (relative to muscle fiber area).
        - **Microvessel-to-fiber ratio.**
3. **Muscle fiber and microvessel interaction analysis (Violet Section):**
    - Using the binary mask of microvessels, an area of proximity around each vessel was created with the “GrowingObject” algorithm.
    - An “AND” operation was performed between the expanded (grown) vessel regions and the muscle fiber mask to isolate areas within muscle fibers that were in close proximity to vessels.
    - Each identified area was assigned to a single microvessel and its corresponding muscle fiber for further analysis.
4. **Feature Extraction (Red Section):**
    - **Muscle fiber–microvessel contact:** Quantifies the number of vessels surrounding each muscle fiber.
    - **Sharing factor:** Quantifies the number of muscle fibers that are associated with a single vessel.

The pipeline outputs these results for downstream analysis, providing quantitative insights into the interaction between muscle fibers and vasculature.

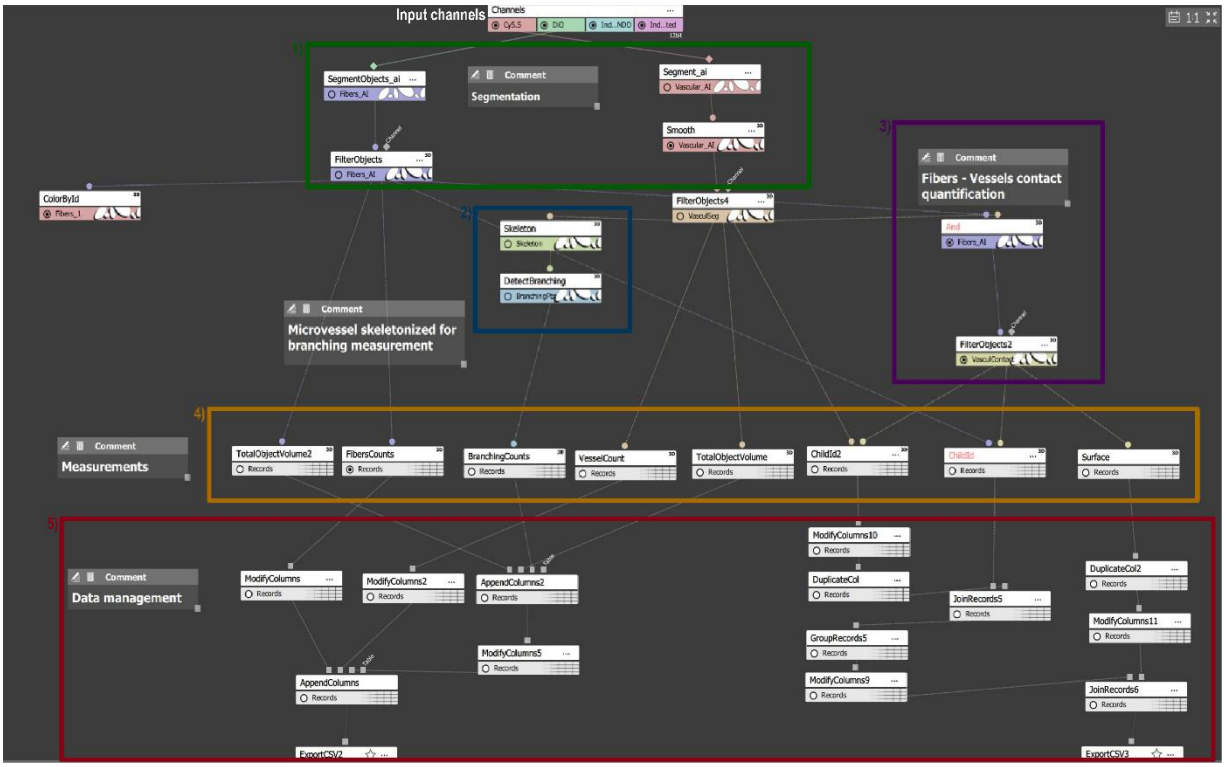


Figure S5: General Analysis 3 (GA3) Pipeline for 3D vasculature and muscle fiber feature extraction. The GA3 pipeline was developed to extract and quantify key features of vasculature and muscle fibers from 3D images, leveraging deep learning segmentation and advanced image processing techniques to investigate their interactions.

1. **Input and Segmentation (Green Section):**
    - The pipeline begins with the application of two U-Net-based deep learning models:
        - *Segment.Object.ai* for segmenting green autofluorescent muscle fibers.
        - *Segment.ai* for segmenting vasculature from the corresponding input channels.
2. **Vasculature Skeletonizing (Blue Section):**
    - Microvessels were skeletonized to extract their central axis.
    - Branching points were then detected along the skeleton to quantify the degree of vascular ramification.
3. **Vasculature Embedded Surface on Muscle Fibers (Violet Section):**
    - A binary operation was performed on the binary masks of muscle fibers and vasculature to isolate the surface of interaction between the two structures.

- This enabled the quantification of the embedded surface area where vasculature interacts with muscle fibers.

4. **Quantifications (Orange Section):**
    - Various structural and interaction-related metrics were measured, including:
        - **Total volumes** of muscle fibers and vasculature, used to calculate vessel density relative to fibers.
        - **Counts of muscle fibers and vessels.**
        - **Branching points** of the vasculature, reflecting its structural complexity.
        - **Surface area of embedded vasculature**, which was linked to the corresponding muscle fibers and vessels for further analysis.

This 3D pipeline provides an integrated framework for characterizing the structural organization and interactions between vasculature and muscle fibers in a three-dimensional context.

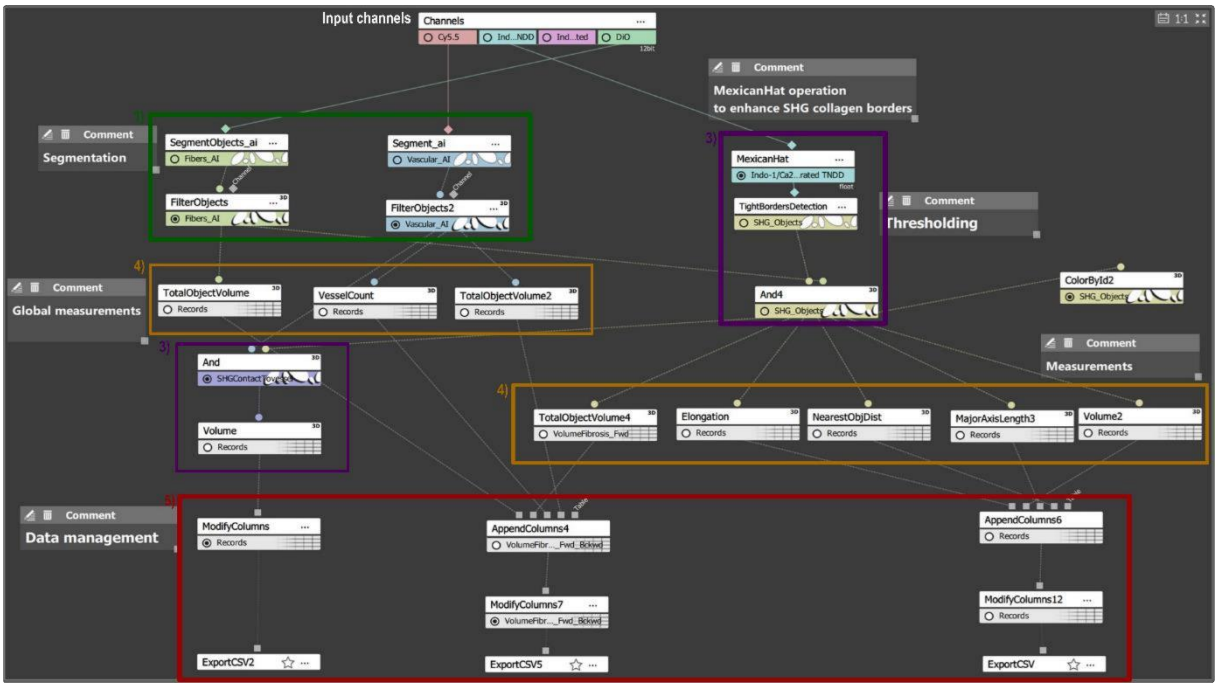


Figure S6: General Analysis 3 (GA3) Pipeline for 3D SHG-collagen feature extraction. The GA3 pipeline was developed to extract and quantify key features of SHG^+ objects-from 3D images, integrating deep learning segmentation and advanced image preprocessing for detailed structural and interaction analysis.

Input and Segmentation (Green Section):

The pipeline starts with the application of two U-Net-based deep learning models:

Segment.Object.ai for segmenting green autofluorescent muscle fibers.

Segment.ai for segmenting vasculature from the corresponding input channels.

SHG-Collagen Preprocessing and Segmentation (Violet Section):

A Laplacian of Gaussian filter (also known as "Mexican Hat") with a sigma parameter set to 2.7 was applied to enhance SHG^+ network boundaries.

Edge-based thresholding was performed on the processed SHG signal to segment the SHG^+ objects.

Two binary "AND" operations were used for further refinement: The first operation between muscle fiber masks and SHG^+ objects isolated endomysial SHG for focused analysis.

The second operation between SHG^+ objects and vasculature masks identified regions where microvessels and SHG^+ objects overlapped.

Feature Measurements (Orange Section):

Key metrics were extracted, including: Total volumes of muscle fibers and SHG^+ objects, enabling the calculation of SHG^+ objects network density relative to fibers. Overlap volume between SHG^+ objects and vasculature, quantifying their spatial interactions. Morphometric features of SHG^+ objects, such as volume, elongation, and nearest-object distances to assess their structural characteristics.

VI. Atteintes mitochondriales et dysfonctionnement lysosomal dans la maladie de Pompe

VI.1. Positionnement du sujet

La maladie de Pompe est une maladie lysosomale rare caractérisée par l'accumulation massive de glycogène au sein des lysosomes *(van der Ploeg and Reuser, 2008)*. Cette accumulation perturbe profondément l'architecture interne de la fibre, contribuant à sa fragilisation et à sa perte de fonction *(Raben et al., 2010)*.

Les atteintes sur les mitochondries rapportées traduisent des morphologies anormales et des pertes de crêtes mitochondriales *(Lewandowska et al., 2008)*. Plus récemment, il a été montré, dans des fibroblastes de souris, une diminution du potentiel membranaire mitochondrial accompagnée d'une accumulation de mitochondries endommagées et mal recyclées, suggèrant une altération de la mitophagie dans la maladie de Pompe *(Lim et al., 2015).*

La plupart des descriptions du compartiment mitochondrial dans la maladie de Pompe repose sur la microscopie électronique qui offre une résolution structurale inégalée mais présente des limites pour appréhender à grande échelle l'organisation du réseau *(Fernández et al., 1999; Lewandowska et al., 2008; Raben et al., 2012).* Cela souligne la nécessité de méthodes de quantification capables de caractériser le réseau mitochondrial au sein de la fibre musculaire ainsi que les interactions avec d'autres organites.

Le modèle murin GAA-KO 6neo/6neo ($Gaa^{-/-}$) constitue actuellement le modèle le plus pertinent pour l'étude de la maladie de Pompe. Il reproduit fidèlement les lésions observées chez les patients, notamment la surcharge glycogénique et l'accumulation de débris autophagiques dans le muscle squelettique. Toutefois, les altérations mitochondriales dans ce modèle restent largement inexplorées.

VI.2. Objectifs scientifiques

Notre étude vise à caractériser le réseau mitochondrial dans le muscle squelettique atteint par la maladie de Pompe, à analyser ses interactions avec les lysosomes et les autophagosomes, et à évaluer ces paramètres en fonction du métabolisme des fibres musculaires (oxydatif et glycolytique) par le déploiement d'une approche originale de bio-imagerie.

VI.3. Résumé de la démarche expérimentale

Notre analyse a été menée à deux stades d'évolution de la maladie : i) 1 mois, correspondant à la période pré-symptomatique et ii) 4 mois, correspondant à la période post-apparition des signes cliniques.

Deux types de muscles ont été étudiés, reflétant des profils métaboliques distincts, en l'occurrence : i) le muscle *Soléaire* qui est, riche en fibres oxydatives et ii) le muscle *Gastrocnémien* qui est à dominante glycolytique.

Les mitochondries ont été marquées à l'aide de l'anticorps TOMM20 (*Translocase of Outer Mitochondrial Membrane*), ciblant une protéine de la membrane externe mitochondriale, ainsi que de la citrate synthase, enzyme localisée dans la matrice. En parallèle, les lysosomes et autophagosomes ont été respectivement détectés à l'aide des anticorps LAMP-1 et LC3. Seules les coupes longitudinales ont été retenues pour l'analyse. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal NSPARC (Nikon Europe BV, Amstelveen).

L'analyse des images a été conduite grâce à un *pipeline* développé sur la base d'un U-Net, permettant la segmentation précise des mitochondries, des lysosomes et des autophagosomes. Ce *pipeline* a fourni des mesures quantitatives détaillées, incluant : i) la morphologie et la connectivité du réseau mitochondrial, ii) la densité et le volume des organites lysosomaux et autophagiques, et iii) la colocalisation mitochondries/lysosomes.

VI.4. Résumé des résultats

L'utilisation de la super-résolution a permis d'atteindre une résolution spatiale d'environ 120 nm. L'analyse des images ainsi obtenues a mis en évidence une altération de la densité mitochondriale à l'âge de 4 mois, tandis que cette perturbation apparaît moins marquée à 1 mois. Sur le plan morphologique, le réseau mitochondrial demeure relativement préservé aux deux stades considérés (1 et 4 mois). En parallèle, nous avons observé des altérations lysosomales dès l'âge précoce de 1 mois, en cohérence avec des travaux antérieurs *(Lagalice et al., 2018; Raben et al., 2012).*

Cette étude apporte non seulement des éléments quantitatifs sur la dynamique des altérations mitochondriales et lysosomales dans ce modèle pathologique, mais propose également une approche méthodologique généralisable, susceptible d'être appliquée à d'autres maladies caractérisées par des dysfonctionnements mitochondriaux. L'ensemble des méthodes et des résultats est décrit en détail dans l'article associé.

Super-resolution imaging with deep learning-based segmentation for detailed characterization of mitochondrial impairment in Pompe disease muscle

Introduction

Pompe disease (glycogen storage disease type II) is an autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by mutations in the GAA gene, which encodes acid α-glucosidase (GAA), the lysosomal hydrolase responsible for glycogen degradation [1–3]. Loss of GAA activity leads to abnormal accumulation of glycogen within lysosomes, particularly in skeletal, respiratory and cardiac muscles, causing progressive muscle weakness and atrophy [4, 5]. Two clinical phenotypes are classically distinguished. The Infantile-Onset Pompe disease (IOPD) form is the most severe, characterized by an almost complete absence of GAA activity (<2%) and rapid progression with hypertrophic cardiomyopathy and profound skeletal muscle weakness [6, 7]. In contrast, the Late-Onset Pompe disease (LOPD) form retains residual enzymatic activity (2–40%) and exhibits a broader clinical spectrum with slower but relentless progression, predominantly involving skeletal and respiratory muscles [4, 7]. In both forms, skeletal muscle impairment is a hallmark feature, clinically manifesting as progressive muscle weakness [8].

At the histopathological level, affected myofibers typically display vacuolation due to the accumulation of enlarged, glycogen-filled lysosomes accompanied by autophagic debris [8, 9]. Abnormal lysosomes vary in both size and spatial distribution depending on the metabolic profile of the myofiber, suggesting that fiber type-specific metabolic properties may influence the level of lysosomal impairment. [10, 11]. Pompe disease muscle is also characterized by a massive autophagic buildup, reflecting impaired fusion between autophagosomes and dysfunctional lysosomes, which exacerbates myofiber damage and contributes to disease progression [9, 10, 12].

In healthy skeletal muscle, mitochondria are organized into a mosaic, interconnected network composed of at least two distinct subtypes: subsarcolemmal mitochondria (SSM), located beneath the sarcolemma and primarily involved in membrane-associated processes, and intermyofibrillar mitochondria (IMF), distributed between myofibrils to provide ATP directly to the contractile apparatus [13–15]. Such highly ordered arrangement is essential for efficient muscle performance. Mitochondrial abnormalities, including morphological changes with fragmentation, paracristalline inclusions, and swelling have been reported in biopsies from both patients and GAA KO mice [16–18]. Loss of mitochondrial cristae and typical elongated tubular shape are also characteristic features[17]. A defect in mitochondrial membrane potential and impaired mitophagy have also been demonstrated in cultured myoblasts derived from GAA KO mice [17]. Finally, growing evidence suggest that organelle crosstalk is profoundly disrupted in Pompe disease, as a result of autophagic buildup that creates a physical and functional barrier that perturbs interactions between them [19].

To date, most descriptions of the mitochondrial compartment in Pompe disease rely on electron microscopy, which offers unparalleled structural resolution but has clear limitations in capturing large-scale connectivity and network organization [16–19]. As a result, there is limited knowledge about how mitochondria, depending on their subcellular location and connection to a metabolic specific fiber type, may be affected by disease, evolve over time, and potentially interact with lysosomes and autophagosomes.

Super-resolution imaging has emerged as a reliable set of techniques to overcome the diffraction limit of conventional confocal microscopy. Stimulated emission depletion (STED) microscopy, for example, can achieve lateral resolutions of ~30 nm and has demonstrated remarkable potential for quantifying mitochondrial cristae periodicity [20–22]. Other single-molecule localization microscopy (SMLM) approaches, such as STORM, DNA-PAINT, or PALM, push the resolution further down to ~20 nm, although typically at the cost of a restricted field of view [23].

In the present study, we proposed an integrated methodology combining super-resolution fluorescence imaging with deep learning-based segmentation to quantitatively characterize the mitochondrial mosaic pattern in skeletal muscle, while simultaneously mapping its interplay with lysosomal and autophagosomal compartments. For this, we employed image scanning microscopy (ISM) using the recently commercialized confocal system NSPARC, which preserves a wide field of view while achieving a lateral resolution of ~120 nm. This approach provides an optimal balance between resolution and volumetric coverage. It was applied to two skeletal muscles from 1- and 4-month-old healthy and $Gaa^{-/-}$ mice to produce a quantitative analysis of mitochondrial network organization [24].

Our methodology enables the visualization and subtype-specific characterization of the mitochondrial network in skeletal muscle, while simultaneously quantifying the interplay between mitochondria and lysosomes across different time points. Leveraging deep learning-based segmentation, we were able to accurately detect and quantify mitochondrial structures within myofibers. In addition, we developed an analysis pipeline to characterize these organelles and their interactions, providing a robust framework for multi-organelle assessment in skeletal muscle.

Materials and Methods

Animals

Gaa$^{-/-}$ mice (GAA-KO 6^{neo}/6^{neo} mouse model) with a targeted disruption of exon 6 in the *Gaa* gene resulting in complete loss of enzymatic activity were used. Breeding heterozygous 6^{neo}/6^{neo} mice were kindly provided by Dr. Nina Raben (NIH, Bethesda, MD, USA) and maintained in the specific pathogen-free animal facility at Oniris (Nantes, France). Gaa$^{-/-}$ homozygous breeding was performed, and wild-type (WT) littermates were bred as controls. Mice were provided with standard mouse chow and water *ad libitum* and housed under a 12:12 h dark:light cycle at 22 °C. All efforts were made to minimize suffering. Rats were provided with environmental enrichment: provision of rolls is reported to potentially modify the behavior of housed animals and reduce chronic pain. All experimental procedures complied with the European Council guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Pays de la Loire region, France (authorization number APAFIS #1267).

Tissue sample

Anesthesia was induced by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (75 mg/kg, Imalgene, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany). Adequate depth of anesthesia was monitored by the absence of reflex responses before proceeding with euthanasia by intracardiac perfusion. The thoracic cavity was opened and phosphate-buffered saline (PBS) was gently perfused through the apex of the left ventricle, followed by 4% paraformaldehyde (PFA). *Soleus* and *Gastrocnemius* muscles were subsequently dissected, post-fixed overnight in 4% PFA, dehydrated, and embedded in paraffin for histological analyses.

Histological and Immunofluorescence Analysis

Paraffin-embedded muscle samples were sectioned at 8 µm thickness using a microtome and mounted on glass slides. Slides were dried overnight at 37°C before processing. Sections were deparaffinized in xylene (3 × 10 min; MC3007581000, VWR) and rehydrated through a graded ethanol series prepared in distilled water: 100% ethanol (3 × 10 min), 95% ethanol (10 min), 70% ethanol (10 min), and 50% ethanol (10 min), with no rinsing between steps. Sections were then transferred into PBS. Antigen retrieval was performed in preheated Tris-EDTA buffer (pH 9; Zytomed) for 40 min, followed by cooling at room temperature (RT) for 20 min. After washing in PBS, sections were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min. Non-specific binding was blocked by incubation (30 min, RT) in PBS containing 0.2% Triton X-100, 10% goat serum, and 2% bovine serum albumin (BSA, A7906, Sigma-Aldrich). Two serial cross-sections from each muscle were processed for immunolabelling. First section was incubated (overnight [ON], 4°C) with antibodies (Ab) diluted in blocking buffer (10% goat serum, 0.2% BSA, 0.2% Triton X-100 in PBS) and directed against TOMM20 (mitochondria outer membrane marker; ab186734,

Abcam), citrate synthase (mitochondria matrix marker; MA517264, Thermofisher scientific), LAMP-1 (553792, BD BIOSCIENCES), and LC3 (83506, CELL SIGNALING TECHNOLOGY) to visualize mitochondria, lysosome and autophagosome, respectively. After washing in PBS (3 × 5 min), sections were incubated (RT, 1 h) with DyLight 405, Alexa Fluor 488, 555, or 647 secondary Abs (1:300, 1:300, 1:300, 1:400, 115475207 Jackson ImmunoResearch ; A21131, A21434, A21245, Invitrogen). After rinsing, slides were mounted with ProLong Gold medium (11559306, Fisher scientific). For the 2nd section, myofiber typing was performed using Abs against slow myosin heavy chain (1:400, ab234431, Abcam) and fast myosin heavy chain (1:500, M4276, Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. After washing in PBS, sections were incubated (RT, 1 h) with Alexa Fluor 555 (1:800, A21428, Invitrogen) and Alexa Fluor 647 (1:1000, A21240, Invitrogen) secondary Abs. After rinsing, nuclei were stained with DAPI (1:2000 in distilled water, 10 min; 10184322, Fisher scientific) followed by washing in PBS and mounting slides with ProLong Gold medium.

Fiber-typing imaging

Myofiber type imaging was performed using a slide scanner (AxioScan, Zeiss, Jena, Germany). Fluorescence excitation was provided by an XCite LED FIRE illumination system (Excelitas Technologies) equipped with appropriate filter sets (refs). Images were acquired using a Plan-Apochromat 10X objective and detected with an ORCA-Flash4.0 monochrome camera (Hamamatsu, Japan).

Super-resolution imaging of organelles

Super-resolution imaging was done using a laser scanning confocal AX-NSPARC microscope (Nikon Europe BV, Amstelveen, Netherlands). Excitation was carried out in two sequential passes to avoid channel crosstalk: the first pass for Alexa Fluor 488, followed by subsequent passes for the remaining fluorophores. Emission was collected using a bandpass filter (502-546 nm) and a quad-band filter set (430-663 nm / 582-618 nm / 663-691 nm). A Plan-Apochromat 60X λD oil immersion objective (NA) was used for signal collection. The field of view (FOV) was set to 150 × 150 µm and scanned at 2048 × 2048 pixels, corresponding to a pixel size of 70 nm. Each FOV was selected to include at least five longitudinal myofibers. For quantitative analysis, a minimum of 5 and 10 regions of interest (ROIs) were acquired from the *Soleus* and the *Gastrocnemius* muscles, respectively. Images were deconvoluted using Richardson-Lucy method with 15 iterations before further analysis.

Deep learning model training

Segmentation of TOMM20 (magenta; mitochondria related dataset), LAMP-1 (orange; lysosome related dataset), and LC3 (cyan; autophagosome related dataset) signals was performed using a U-Net-based deep learning model, "*Segment.ai*", implemented in NIS-Elements software (version 6.10; Nikon Europe BV, Amstelveen, Netherlands). For the TOMM20 labelling, seven cropped XY images were manually annotated using the Weka plugin in Fiji, and the annotations were imported into NIS-Elements for

training. The model was trained for 2,000 iterations on an NVIDIA RTX5000 graphics processing unit (driver version 516.40; NVIDIA, Santa Clara, CA, USA). For the LAMP-1 labelling, nine cropped images were manually annotated in NIS-Elements and used to train the model for 500 iterations. For the LC3 labelling, thirty-three cropped images representing a broad range of morphologies and variable signal intensities were annotated and used for training over 2,500 iterations. Both trainings were performed on the same workstation equipped with the RTX5000 GPU. The trained models were validated on an independent dataset comprising ten manually annotated images. Segmentation performance was evaluated using the following metrics: (1) Precision: fraction of correctly predicted positive regions among all predicted positive regions; (2) Recall (sensitivity / true positive rate): fraction of true positive regions correctly identified; (3) F1 score: harmonic mean of Precision and Recall; and (4) Intersection over Union (IoU, Jaccard Index): degree of overlap between the predicted segmentation and the ground truth.

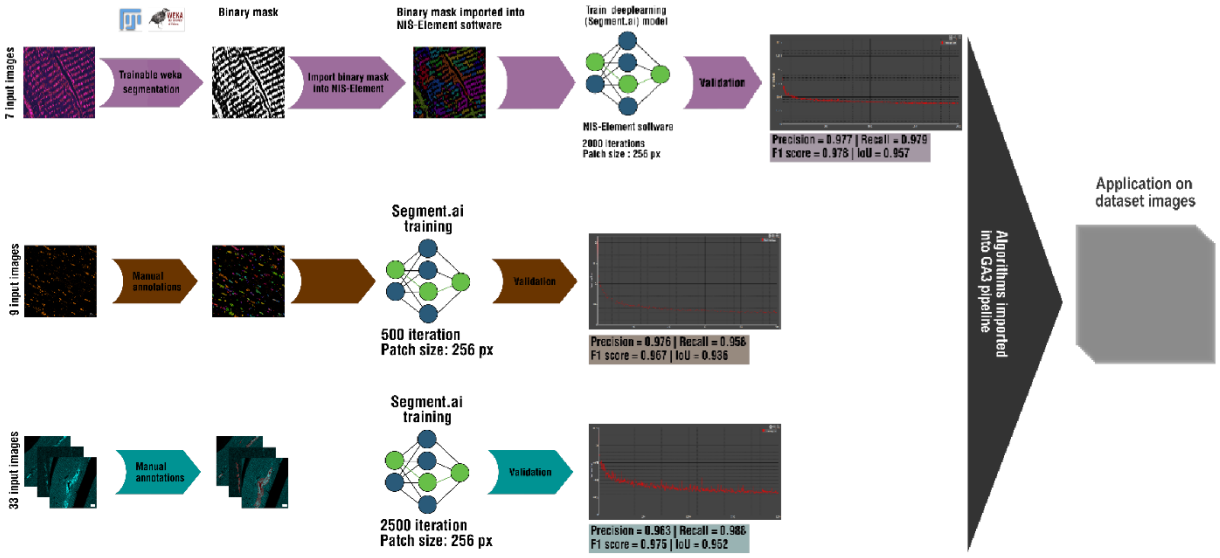


Figure 1. Deep-learning training strategies for organelle segmentation. Representative workflows for segmentation of mitochondria (TOMM20, magenta), lysosomes (LAMP-1, orange), and autophagosomes (LC3, sky blue). Cropped image datasets were annotated and used to train deep-learning models in NIS-Elements, followed by validation on independent datasets.

Image analysis

Morphology of mitochondria was assessed using the General Analysis 3 (GA3) module in NIS-Elements software (version 6.10.1, Nikon Europe BV, Amstelveen, Netherlands). Mitochondria were segmented using the trained *Segment.ai* inference model, which was imported into the GA3 environment. The complete GA3 analysis pipeline (illustrated in Supplementary Figure S1) was applied to 417 regions comprising 2,640 myofibers. Mitochondrial density was calculated as the ratio of the detected mitochondrial surface area to that of the total myofiber surface area. To further characterize network organization, binary masks of segmented mitochondria were

skeletonized. Branching point density was determined by counting the number of branch points normalized to mitochondrial surface area, while branch length distributions were extracted from the skeletonized network to provide quantitative descriptors of mitochondrial architecture. For lysosome morphology, surface density and Feret's diameter (maximum caliper length) were quantified. Autophagosomal abundance was expressed as the surface area of LC3-positive structures relative to myofiber surface area. Finally, organelle interactions were assessed by the calculation of the Pearson's correlation coefficient across the three fluorescence channels, the evaluation of the colocalization between mitochondria and lysosomes as well as between mitochondria and autophagosomes.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (version 4.4.1). Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were conducted using a linear mixed-effects models, implemented in the lme4 package, with random effects structured to account for the hierarchical organization of the data. At the myofiber level, nested random effects were specified with fibers nested within animals, thereby accounting for both within-animal and between-animal variability. Group effect (WT vs. $Gaa^{-/-}$) was modeled as a fixed effect, with model selection adapted according to the aggregation level. All models presented in this study were systematically assessed for independence and normality of residuals, as recommended. Significance was set at $p < 0.05$ for all statistical tests.

Results:

Super-resolution imaging highlighted mitochondria abnormalities in Pompe mice

We first assessed mitochondria impairment in Pompe disease muscle using super-resolution microscopy. To this end, we studied mitochondria density, branching and length, corresponding to criteria classically used to characterize mitochondria [25, 26]. These analyses were conducted on Soleus and Gastrocnemius muscle sections from 1- and 4-month (mo)-old WT and $Gaa^{-/-}$ mice. A dedicated image analysis pipeline was developed for quantification. TOMM20-positive signals were segmented using the trained "Segment.ai" deep-learning model, which was subsequently integrated into the GA3 analysis workflow. Each segmented mitochondrial structure was then assigned to its corresponding myofiber. To distinguish between mitochondrial subtypes, subsarcolemmal (SSM) and intermyofibrillar (IMF) regions were defined by applying iterative circular erosion to the binary myofiber masks, followed by subtraction of the eroded masks from the original outlines. This procedure preserved the geometric fidelity of the fibers while allowing precise delineation of SSM and IMF compartments. Finally, each mitochondrial structure was classified into one of these two subtypes for downstream analysis (Figure 2).

Super resolution imaging observation of longitudinal sections labeled with TOMM20 revealed the presence of swollen mitochondrial structures in Gaa$^{-/-}$ mice *at 1 mo* (Fig. 1). Quantitative descriptors of mitochondrial network architecture were extracted from the segmented datasets. It showed a ratio of mitochondrial surface area to the corresponding myofiber surface area that did not differ significantly between groups of 1-mo-old mice in both Soleus and Gastrocnemius muscles (Table I). This analysis revealed that mitochondrial surface density was unaffected at early disease stages. However, by 4 months of age, it was significantly higher in type I fibers from the soleus muscle of Gaa$^{-/-}$ mice compared with WT controls, both in the IMF ($p = 0.0004$) and SSM ($p = 0.0007$) compartments. In type II fibers, only the SSM compartment showed a significant increase ($p = 0.0039$), whereas no significant differences were observed in the gastrocnemius muscle.

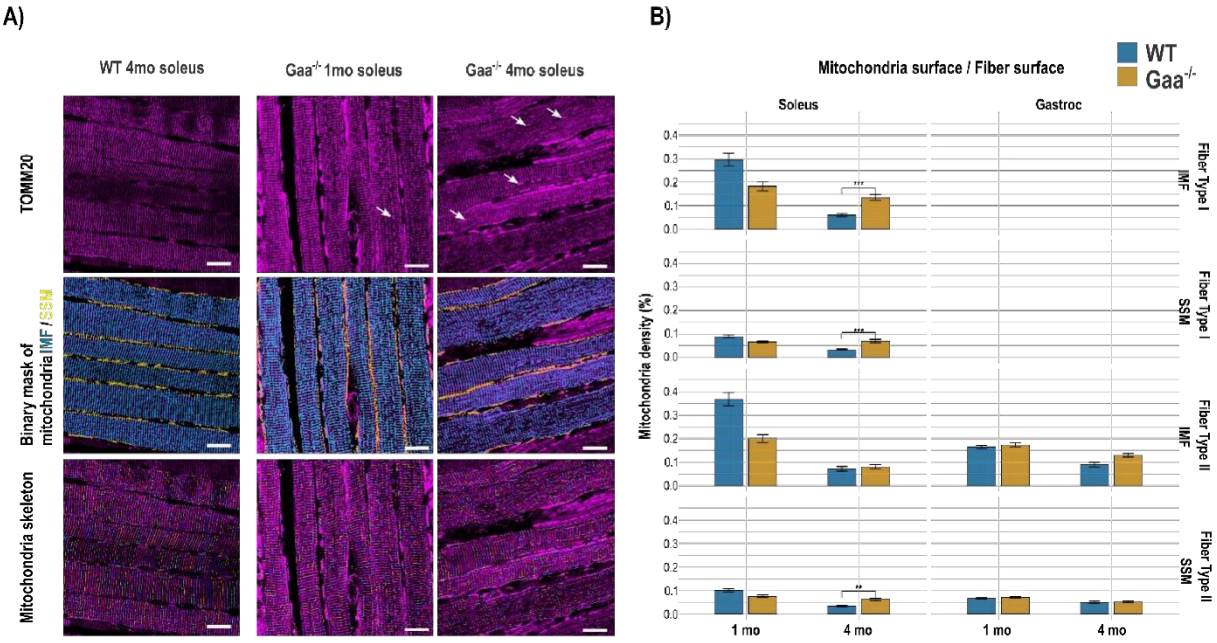


Figure 2. Representative images of mitochondrial networks in wild-type (WT) and Gaa$^{-/-}$ skeletal muscle. A) Top: input images; middle: binary masks of segmented mitochondria; bottom: skeletonized masks illustrating network branching. Scale bar, 20 µm. B) Quantification of mitochondrial density in soleus and gastrocnemius muscles, separated into subsarcolemmal (SSM) and intermyofibrillar (IMF) populations. Statistical analysis was performed using a linear mixed-effects model (**$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

Table 1: Mitochondria surface density per fiber

Age (month)	Muscle	Fiber Type	Region	WT	Gaa-/-
1	*Soleus*	I	IMF	0.25 ± 0.08	0.22 ± 0.08
	Soleus	I	SSM	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01
	Soleus	II	IMF	0.30 ± 0.10	0.24 ± 0.10
	Soleus	II	SSM	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02
	Gastrocnemius	II	IMF	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.01
	Gastrocnemius	II	SSM	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
4	*Soleus*	I	IMF	0.06 ± 0.02	0.13 ± 0.01
	Soleus	I	SSM	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	Soleus	II	IMF	0.06 ± 0.03	0.10 ± 0.02
	Soleus	II	SSM	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01
	Gastrocnemius	II	IMF	0.10 ± 0.03	0.13 ± 0.01
	Gastrocnemius	II	SSM	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01

SSM: Subsarcolemmal Mitochondria, IMF: InterMyoFibrillar

To further assess network topology, segmented mitochondria were skeletonized to compute the number of branch points normalized to mitochondrial surface area defining the branch point density and the branch length distributions. We obtained a branch point density of 554.60 ± 21.53, 578.71 ± 26.35 and 557.60 ± 22.84 in Soleus muscle type I fiber, type II fiber and Gastrocnemius muscle type II fibers of 1-mo-old Gaa-/- mice (Table II). In comparison, they were respectively of 597.44 ± 21.77, 599.50 ± 22.77, 559.75 ± 32.38 in corresponding WT mice. Although the density was numerically lower in $Gaa^{-/-}$ mice, there was no significant difference between groups. The same observation was made at the age of 4 months. In addition, branch length was measured as 1.78 ± 0.03, 1.78 ± 0.04, 1.78 ± 0.04 in 1-mo-old $Gaa^{-/-}$ mice and 1.79 ± 0.03, 1.81 ± 0.03, 1.79 ± 0.08 in WT mice. These values indicated comparable branch length between genotypes, a finding that was also consistent at 4 months.

Table 2: Results value from branching level and branch length measurement

			Branching level ± SEM		***Branch length ±SEM (µm)***	
Age (month)	**Muscle**	**Fiber type**	**WT**	**$Gaa^{-/-}$**	**WT**	**$Gaa^{-/-}$**
1	Soleus	I	597.44 ± 21.77	554.60 ± 21.53	1.79 ± 0.03	1.78 ± 0.03
	Soleus	II	599.50 ± 22.77	578.71 ± 26.35	1.81 ± 0.03	1.78 ± 0.04
	Gastrocnemius	II	559.75 ± 32.38	557.60 ± 22.84	1.79 ± 0.08	1.78 ± 0.04
4	Soleus	I	504.48 ± 49.37	489.05 ± 11.64	1.77 ± 0.18	1.84 ± 0.02
	Soleus	II	517.19 ± 54.05	479.24 ± 15.70	1.77 ± 0.22	1.79 ± 0.03
	Gastrocnemius	II	578.42 ± 41.72	550.88 ± 14.94	1.78 ± 0.06	1.74 ± 0.01

Taken together, these results suggest that despite clear morphological abnormalities in Pompe skeletal muscle (Figure 2), mitochondrial network topology reflected by branching density and branch length remains preserved at early and intermediate stages of the disease.

Lysosomes altered at early stage

To determine whether the observations made on the mitochondria could not be linked to the original damage described on the lysosomes and the autophagosomes, we then assessed successively the lysosomal compartment within SS (Subarcolemmal) or IMF regions and the autophagosome overload in fiber type. In line with previous reports indicating that lysosomal storage differs according to the metabolic type of myofiber [11, 19], We analyzed the surface density and Feret diameter of lysosomes jointly in type I and II fibers. Both parameters were significantly higher in $Gaa^{-/-}$ mice compared with WT controls, indicating enlarged lysosomes occupying a greater proportion of the fiber area (Figure 3, Table 3). Specifically, Feret diameters were 1.04 ± 0.01 µm, 1.07 ± 0.01 µm, and 1.23 ± 0.03 µm in the IMF compartment of soleus type I fibers, soleus type II fibers, and gastrocnemius type II fibers of 1-month-old $Gaa^{-/-}$ mice, respectively. In comparison, values were markedly lower in WT mice (0.78 ± 0.02 µm, 0.79 ± 0.02 µm, and 0.82 ± 0.01 µm, respectively). In parallel, lysosomal footprint was also increased in $Gaa^{-/-}$ fibers, with values of 0.06 ± 0.00 %, 0.06 ± 0.00 %, and 0.11 ± 0.00 %, compared with 0.04 ± 0.00 %, 0.05 ± 0.00 %, and 0.04 ± 0.00 % in WT controls. Notably, type II fibers from gastrocnemius muscle of $Gaa^{-/-}$ mice showed an occupied lysosomal area of 0.11 ± 0.00%, nearly double that observed in other fiber groups (Figure 3, Table 3).

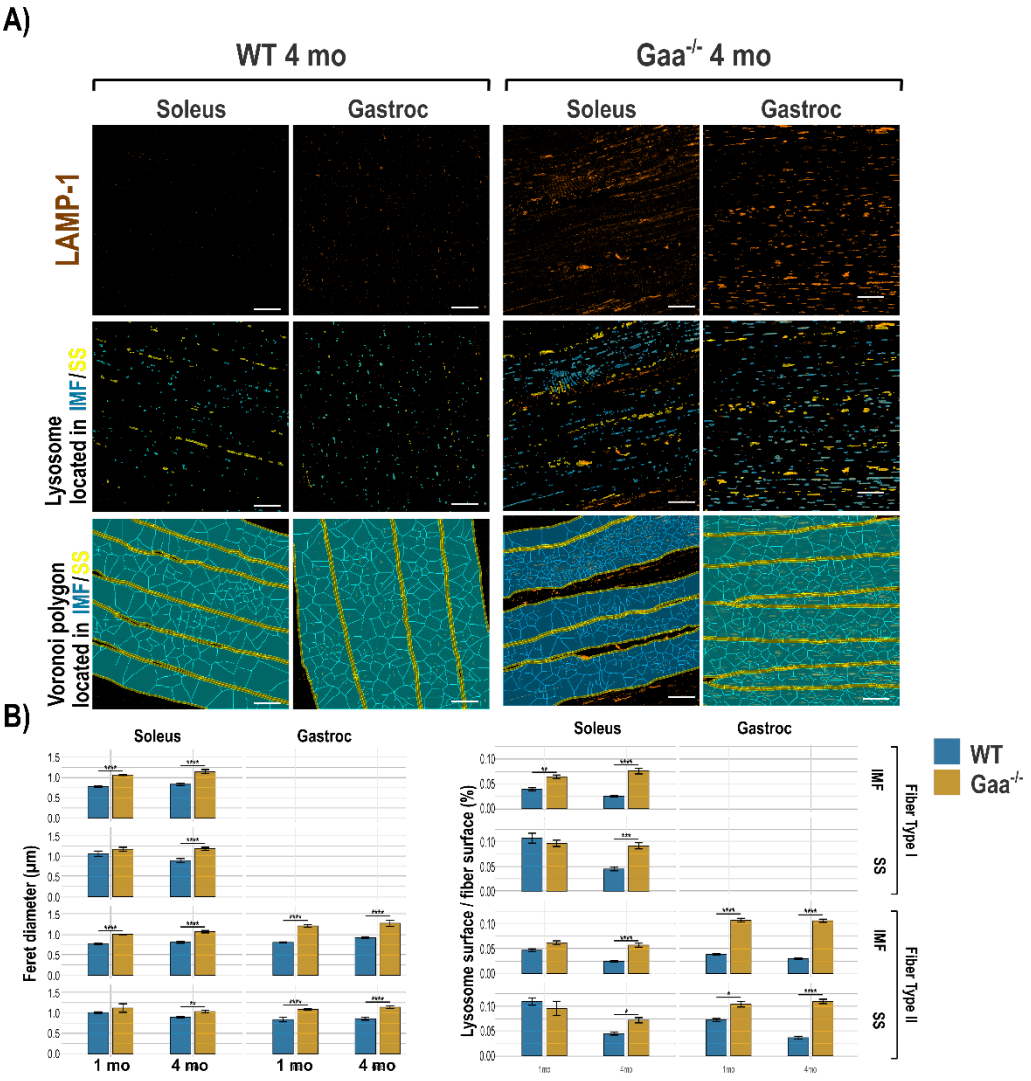


Figure 3. Representative images of lysosomes in wild-type (WT) and Gaa$^{-/-}$ skeletal muscle. Top: input images; middle: segmented lysosomes; bottom: Voronoi diagrams illustrating spatial distribution within fibers. Scale bar, 20 µm. Quantification of lysosomal Feret diameter and lysosomal surface density in fibers, separated into subsarcolemmal (SS) and intermyofibrillar (IMF) regions. Lysosomes progressively enlarged and became more compactly distributed with age, particularly in type II fibers. Statistical analysis was performed using a linear mixed-effects model (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

To investigate whether lysosomal clustering patterns were altered, we applied a Voronoi diagram analysis to the binary masks of lysosomal structures, measuring the equivalent diameter of each polygon as an index of spatial distribution. This approach enabled the quantification of lysosomal proximity, distinguishing between random versus tightly packed distributions. No significant differences were detected between 1-mo-old mice groups. In contrast, proximity distances between LAMP-1^{+} objects were significantly reduced in 4-month-old Gaa$^{-/-}$ mice, indicating tighter lysosomal clustering. This was particularly evident in the IMF compartment ($p = 0.0067$, 0.0565, and 0.0012 for soleus type I, soleus type II, and gastrocnemius type II fibers, respectively). At the SSM level, significant reductions were observed only in type II fibers ($p = 0.0257$ and <0.0001 for soleus and gastrocnemius, respectively). In parallel, autophagosomes defined as LC3+ objects progressively accumulated with age, with the most pronounced alterations observed in type II fibers, although type I fibers were also affected, no statistical significance observed. These results suggest that lysosomal expansion is accompanied by an abnormal redistribution, leading to pathological clustering that may disrupt local organelle interactions. Moreover, these findings indicate that lysosomal and autophagosome accumulation occur concomitantly in a fiber type dependent manner, thereby exacerbating structural imbalance and contributing to the progressive disruption of muscle homeostasis in Pompe disease.

Table 3:Measurements for lysosomes features

				Diameter		*Surface occupied (%)*		*Voronoi EqDiamter (µm)*	
Age (month)	**Muscle**	**FiberType**	**Region**	**WT**	**Gaa$^{-/-}$**	**WT**	**Gaa$^{-/-}$**	**WT**	**Gaa$^{-/-}$**
1	*Soleus*	I	IMF	0.78 ± 0.02	1.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	6.52 ± 0.83	6.04 ± 0.32
	Soleus	I	SS	1.02 ± 0.03	1.16 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	2.66 ± 0.17	2.78 ± 0.11
	Soleus	II	IMF	0.79 ± 0.02	1.07 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	6.76 ± 0.88	6.27 ± 0.31
	Soleus	II	SS	1.06 ± 0.06	1.16 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	2.72 ± 0.16	2.83 ± 0.11
	Gastrocnemius	II	IMF	0.82 ± 0.01	1.23 ± 0.03	0.04 ± 0.00	0.11 ± 0.00	6.03 ± 0.31	6.61 ± 0.11
	Gastrocnemius	II	SS	0.86 ± 0.06	1.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.10 ± 0.01	2.48 ± 0.11	2.94 ± 0.06
4	*Soleus*	I	IMF	0.87 ± 0.02	1.08 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.08 ± 0.01	7.29 ± 0.57	6.04 ± 0.23
	Soleus	I	SS	0.93 ± 0.02	1.10 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.09 ± 0.01	3.02 ± 0.16	2.55 ± 0.14
	Soleus	II	IMF	0.86 ± 0.04	1.15 ± 0.04	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.00	7.22 ± 0.29	6.40 ± 0.24
	Soleus	II	SS	0.91 ± 0.05	1.18 ± 0.03	0.04 ± 0.00	0.07 ± 0.01	3.03 ± 0.13	2.87 ± 0.14
	Gastrocnemius	II	IMF	0.94 ± 0.02	1.28 ± 0.05	0.03 ± 0.00	0.11 ± 0.00	7.63 ± 0.35	6.47 ± 0.15
	Gastrocnemius	II	SS	0.89 ± 0.03	1.15 ± 0.03	0.04 ± 0.00	0.11 ± 0.00	3.02 ± 0.06	2.58 ± 0.06

SS: SubSarcolemmal region, IMF: InterMyoFibrillar

Mitochondria-lysosome contact site enhanced in Pompe muscle

Given the results obtained above and the contact sites already described between mitochondria and lysosomes in HeLa cells where they regulate mitochondrial fission [27], We next investigated whether organelle contacts were altered in Pompe disease. To this end, super-resolution imaging was used to quantify the spatial relationship between mitochondria ($TOMM20^+$ objects) and lysosomes ($LAMP\text{-}1^+$ objects) in myofibers. For this analysis, only $TOMM20^+$ and $LAMP\text{-}1^+$ objects in direct contact (either border-to-border or lysosomes embedded within $TOMM20^+$ objects) were considered as positive events (Figure 4). Compared with wild-type controls, $Gaa^{-/-}$ mice displayed an increase in mitochondria-lysosome contact events (Figure 4). These interactions were most pronounced at 4 months of age, both in soleus and gastrocnemius muscles ($p < 0.0001$, 0.0111, < 0.0001 for soleus type I, type II at IMF, and gastrocnemius IMF, respectively). Notably, such alterations were already detectable in gastrocnemius muscle as early as 1 month, at both IMF and SS regions (Figure 4). Subtypes-specific analysis further revealed that IMF mitochondria exhibited the highest frequency of lysosomal contacts, suggesting that enhanced mitochondria-lysosome coupling is a generalized feature of Pompe disease rather than being restricted to SSM compartments. Together, these results demonstrate an increase in mitochondria-lysosome interactions in Pompe disease muscle, particularly in type II fiber-enriched muscle.

Table 4: Mitochondria-lysosomes contact sites events

				Mean Nb event		***Mitochondria-lysosomes contact rate(%)***	
Age (month)	**Muscle**	**FiberType**	**Region**	**WT**	**$Gaa^{-/-}$**	**WT**	**$Gaa^{-/-}$**
1	*Soleus*	I	IMF	51.01 ± 3.96	85.02 ± 5.03	3.08 ± 0.13	3.51 ± 0.14
	Soleus	I	SSM	0.4 ± 0.07	0.38 ± 0.07	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02
	Soleus	II	IMF	36.68 ± 2.27	68.26 ± 3.74	3.15 ± 0.12	3.68 ± 0.12
	Soleus	II	SSM	0.39 ± 0.05	0.4 ± 0.07	0.16 ± 0.05	0.29 ± 0.14
	Gastrocnemius	II	IMF	54.15 ± 1.93	75.82 ± 2.35	2.39 ± 0.05	3.42 ± 0.06
	Gastrocnemius	II	SSM	0.42 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01
4	*Soleus*	I	IMF	75.97 ± 9.31	105.37 ± 7.82	1.81 ± 0.15	3.58 ± 0.15
	Soleus	I	SSM	0.51 ± 0.09	0.32 ± 0.06	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02
	Soleus	II	IMF	70.16 ± 9.63	105.93 ± 7.38	1.79 ± 0.12	2.61 ± 0.12
	Soleus	II	SSM	0.59 ± 0.1	0.32 ± 0.08	0.19 ± 0.05	0.11 ± 0.03
	Gastrocnemius	II	IMF	65.95 ± 5.34	117.86 ± 4.28	2.31 ± 0.11	4.12 ± 0.09
	Gastrocnemius	II	SSM	0.18 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.01

SSM: Subsarcolemmal Mitochondria, IMF: InterMyoFibrillar

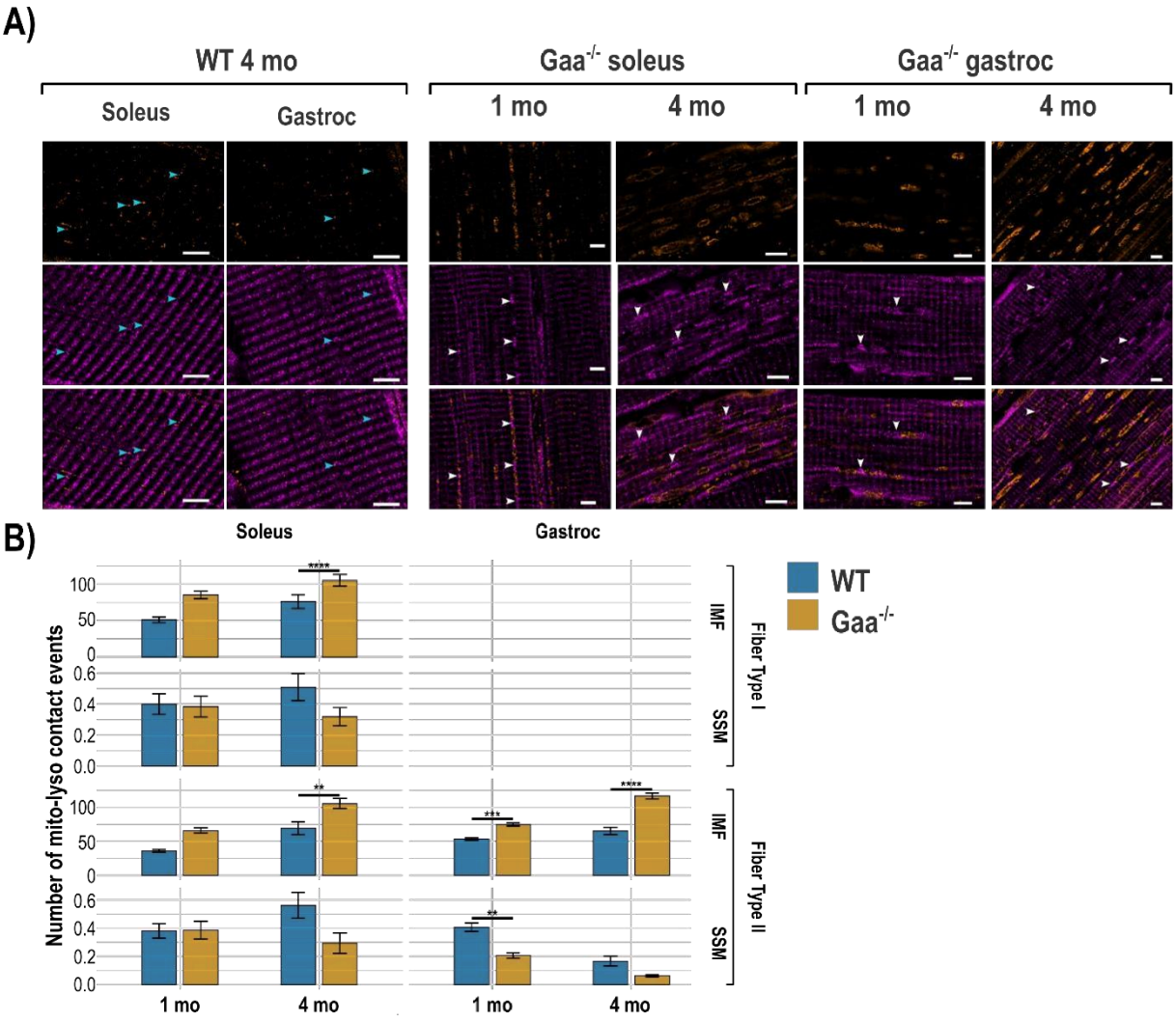


Figure 4. Mitochondria-lysosome interactions in WT and Gaa$^{-/-}$ skeletal muscle. A) Representative images of lysosomes (LAMP-1, orange) and mitochondria (TOMM20, magenta). Top: single-channel images; bottom: merged images. In WT, only 4-month muscle is shown. Sky-blue arrowheads highlight mitochondria in close proximity to lysosomes. In Gaa$^{-/-}$ fibers, abnormal mitochondria were already evident at 1 month (arrowheads) and became more pronounced by 4 months, often closely associated with lysosomal structures. Scale bar, 5 µm. B) Quantification of mitochondria-lysosome contact events based on border-to-border distance (threshold <100 nm). In intermyofibrillar (IMF) regions, events were significantly increased in soleus at 4 months, while in gastrocnemius, events were already elevated at 1 month and further increased at 4 months. Statistical analysis was performed using a linear mixed-effects model (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

Discussion

Mitochondria are well-described as the "powerhouses" of the cell with essential roles in bioenergetics, calcium buffering, and diverse signaling pathways [28]. Their close functional relationship with lysosomes is increasingly recognized, particularly in the regulation of mitochondrial dynamics and calcium homeostasis [27, 29]. In lysosomal storage diseases, mitochondrial alterations have been widely reported, including organelle fragmentation and impaired function particularly illustrated by reduced ATP production [30]. In Pompe disease, previous studies have described mitochondrial abnormalities such as paracrystalline inclusions, swelling, and fragmented morphology [16, 19]. Both morphological changes and impaired mitochondrial metabolism reported *in vitro* with cultured myoblasts extended these initial observations [17]. However, investigations in skeletal muscle tissue, considering fiber type specific metabolism, age-dependent progression, and organelle interactions remain limited.

In this study, we combined super-resolution imaging with deep learning–based image analysis to systematically examine mitochondrial and lysosomal alterations in skeletal muscle of Pompe disease. By correlating organelle imaging with fiber type, our methodology provides novel insights into the spatial organization of mitochondria and lysosomes and their pathological interplay throughout disease progression. In particular, we have produced the demonstration that super-resolution imaging, with a lateral resolution of ~120 nm, enabled precise detection of mitochondria, lysosomes, and autophagosomes within skeletal muscle, when coupled with deep learning-based segmentation. Then, the GA3 pipeline developed here produced robust and reproducible quantitative measurements, extending analysis beyond descriptive observation.

Consistent with ultrastructural studies already done in patients and animal models [16, 18, 19], we detected swollen mitochondria and disrupted network organization in diseased muscle. Interestingly, we determined that if mitochondrial density was preserved at early stages, in return it was significantly increased in *Soleus* muscle parallel to the progression of the disease, revealing a dynamic process. This delayed onset could support the idea that mitochondrial defects are secondary to lysosomal expansion and autophagic buildup, which physically disrupt mitochondrial positioning and connectivity. Our skeleton-based analysis did not reveal significant reductions in mitochondrial branching density or segment length that is in disagreement with a previous study [15], suggesting that network fragmentation may occur later in the disease or under different physiological stresses.

Concerning the lysosomal compartment, we noticed that impairment is already evident from the first weeks of postnatal life, consistent with its primary role in disease pathogenesis. Lysosomes progressively enlarged and formed compact clusters with age, especially in type II fibers, which are more glycolytic and metabolically vulnerable [10, 11, 19]. In addition, a shift from random to compact lysosomal distributions was established, reflecting progressive and targeted cytoplasmic crowding. Such

remodeling likely imposes both mechanical and metabolic stress on the surrounding cytoplasm, exacerbating myofiber dysfunction. Importantly, this analytical pipeline provides a comprehensive quantitative framework for lysosomal remodeling, surpassing the limits of purely descriptive studies.

A major finding of the present study is the identification of enhanced mitochondria–lysosome interactions as a hallmark of Pompe skeletal muscle pathology. Indeed, the number of contact sites was significantly increased, particularly in myofibers from the *Gastrocnemius* muscle of 1- and 4-mo-old $Gaa^{-/-}$ mice. Subtype-specific analysis revealed that IMF mitochondria were most frequently engaged in contacts, consistent with their proximity to contractile elements and high energetic demands. If such contacts are essential for mitochondrial quality control under physiological conditions, [27, 29], it can be assumed that in increased and concentrated quantity in Pompe disease context they may become maladaptive, driving mitochondrial dysfunction, impaired mitophagy, and energetic failure [17, 19, 31].

Taken together, we demonstrate the feasibility of applying deep learning-based segmentation to efficiently resolve complex structures such as mitochondria in skeletal muscle tissue. Our results support a pathological cascade in Pompe disease in which early lysosomal enlargement and clustering progressively destabilize mitochondrial network architecture, ultimately linking lysosomal dysfunction to mitochondrial impairment. A limitation of this study is its reliance on longitudinal sections, which may not fully capture remodeling events throughout the entire fiber. Nevertheless, our integrated super-resolution imaging and analysis pipeline provides a powerful framework for investigating mitochondrial morphology and organelle interactions *in situ*, which could be applied to diverse pathologies involving mitochondrial dysfunction.

Acknowledgements

We thank the technical staff of the Oniris rodent facility (Nantes, France) for animal care. We are also grateful to the Nikon Imaging Centre at Institut Curie-CNRS for providing access to advanced microscopy equipment and expertise.

Funding

Ibrahim Hassani received a PhD grant from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, grant n° 2022/0868) in collaboration with Nikon France Healthcare (succursale Nikon Europe BV).

Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Raben N, Plotz P, Byrne BJ. Acid α-Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease). 2002.

2. Reuser A. Glycogen Storage Disease Type II. In: Lang F, editor. Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 728–9. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29676-8_713.

3. HERS H. α-Glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease). Biochemical Journal. 1963;86:11–6. https://doi.org/10.1042/bj0860011.

4. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. The Lancet. 2008;372:1342–53. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X.

5. Van Den Hout HMP, Hop W, Van Diggelen OP, Smeitink JAM, Smit GPA, Poll-The B-TT, et al. The Natural Course of Infantile Pompe's Disease: 20 Original Cases Compared With 133 Cases From the Literature. Pediatrics. 2003;112:332–40. https://doi.org/10.1542/peds.112.2.332.

6. Byrne BJ, Kishnani PS, Case LE, Merlini L, Müller-Felber W, Prasad S, et al. Pompe disease: Design, methodology, and early findings from the Pompe Registry. Molecular Genetics and Metabolism. 2011;103:1–11. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.02.004.

7. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. Genetics in Medicine. 2006;8:267–88. https://doi.org/10.1097/01.gim.0000218152.87434.f3.

8. Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC-H, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease. Laboratory Investigation. 2006;86:1208–20. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700484.

9. Hesselink RP, Wagenmakers AJM, Drost MR, Van der Vusse GJ. Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2003;1637:164–70. https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00229-6.

10. Fukuda T, Ewan L, Bauer M, Mattaliano RJ, Zaal K, Ralston E, et al. Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease. Annals of Neurology. 2006;59:700–8. https://doi.org/10.1002/ana.20807.

11. Raben N, Roberts A, Plotz PH. Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. 2006.

12. Lagalice L, Pichon J, Gougeon E, Soussi S, Deniaud J, Ledevin M, et al. Satellite cells fail to contribute to muscle repair but are functional in Pompe disease (glycogenosis type II). acta neuropathol commun. 2018;6:116. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0609-y.

13. Parry HA, Willingham TB, Giordano KA, Kim Y, Qazi S, Knutson JR, et al. Impact of capillary and sarcolemmal proximity on mitochondrial structure and energetic function in skeletal muscle. The Journal of Physiology. 2024;:JP286246. https://doi.org/10.1113/JP286246.

14. Glancy B, Hartnell LM, Combs CA, Femnou A, Sun J, Murphy E, et al. Power Grid Protection of the Muscle Mitochondrial Reticulum. Cell Reports. 2017;19:487–96. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.063.

15. Faitg J, Davey T, Turnbull DM, White K, Vincent AE. Mitochondrial morphology and function: two for the price of one! Journal of Microscopy. 2020;278:89–106. https://doi.org/10.1111/jmi.12891.

16. Lewandowska E, Wierzba-Bobrowicz T, Rola R, Modzelewska J, Stępień T, Ługowskka A, et al. Pathology of skeletal muscle cells in adult-onset glycogenosis type II (Pompe disease): ultrastructural study. Folia Neuropathologica. 2008.

17. Lim J-A, Li L, Kakhlon O, Myerowitz R, Raben N. Defects in calcium homeostasis and mitochondria can be reversed in Pompe disease. Autophagy. 2015;11:385–402. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009779.

18. Fernández R, Fernández JM, Cervera C, Teijeira S, Teijeiro A, Domínguez C, et al. Adult glycogenosis II with paracrystalline mitochondrial inclusions and Hirano bodies in skeletal muscle. Neuromuscular Disorders. 1999;9:136–43. https://doi.org/10.1016/S0960-8966(98)00117-5.

19. Raben N, Wong A, Ralston E, Myerowitz R. Autophagy and mitochondria in Pompe disease: Nothing is so new as what has long been forgotten. Am J Med Genet. 2012;160C:13–21. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31317.

20. Liu T, Stephan T, Chen P, Keller-Findeisen J, Chen J, Riedel D, et al. Multi-color live-cell STED nanoscopy of mitochondria with a gentle inner membrane stain. Proc Natl Acad Sci USA. 2022;119. https://doi.org/10.1073/pnas.2215799119.

21. Wildanger D, Rittweger E, Kastrup L, Hell SW. STED microscopy with a supercontinuum laser source. Opt Express. 2008;16:9614. https://doi.org/10.1364/oe.16.009614.

22. Vicidomini G, Moneron G, Eggeling C, Rittweger E, Hell SW. STED with wavelengths closer to the emission maximum. Opt Express. 2012;20:5225. https://doi.org/10.1364/oe.20.005225.

23. Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, Eggeling C, Sauer M, Biehlmaier O, et al. Super-resolution microscopy demystified. Nat Cell Biol. 2019;21:72–84. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8.

24. Mito T, Vincent AE, Faitg J, Taylor RW, Khan NA, McWilliams TG, et al. Mosaic dysfunction of mitophagy in mitochondrial muscle disease. Cell Metabolism. 2022;34:197-208.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.017.

25. Chaudhry A, Shi R, Luciani DS. A pipeline for multidimensional confocal analysis of mitochondrial morphology, function, and dynamics in pancreatic β-cells. American

Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2020;318:E87–101. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00457.2019.

26. Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, Moradi F, Stuart JA. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. Acta Histochemica. 2017;119:315–26. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.03.001.

27. Wong YC, Ysselstein D, Krainc D. Mitochondria–lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. Nature. 2018;554:382–6. https://doi.org/10.1038/nature25486.

28. Lee-Glover LP, Picard M, Shutt TE. Mitochondria – the CEO of the cell. Journal of Cell Science. 2025;138:jcs263403. https://doi.org/10.1242/jcs.263403.

29. Peng W, Wong YC, Krainc D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial Ca^{2+} dynamics via lysosomal TRPML1. Proc Natl Acad Sci USA. 2020;117:19266–75. https://doi.org/10.1073/pnas.2003236117.

30. De La Mata M, Cotán D, Villanueva-Paz M, De Lavera I, Álvarez-Córdoba M, Luzón-Hidalgo R, et al. Mitochondrial Dysfunction in Lysosomal Storage Disorders. Diseases. 2016;4:31. https://doi.org/10.3390/diseases4040031.

31. Zhang M, Niu J, Xu M, Wei E, Liu P, Sheng G. Interplay between mitochondrial dysfunction and lysosomal storage: challenges in genetic metabolic muscle diseases with a focus on infantile onset Pompe disease. Front Cardiovasc Med. 2024;11:1367108. https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1367108.

Supplementary data:

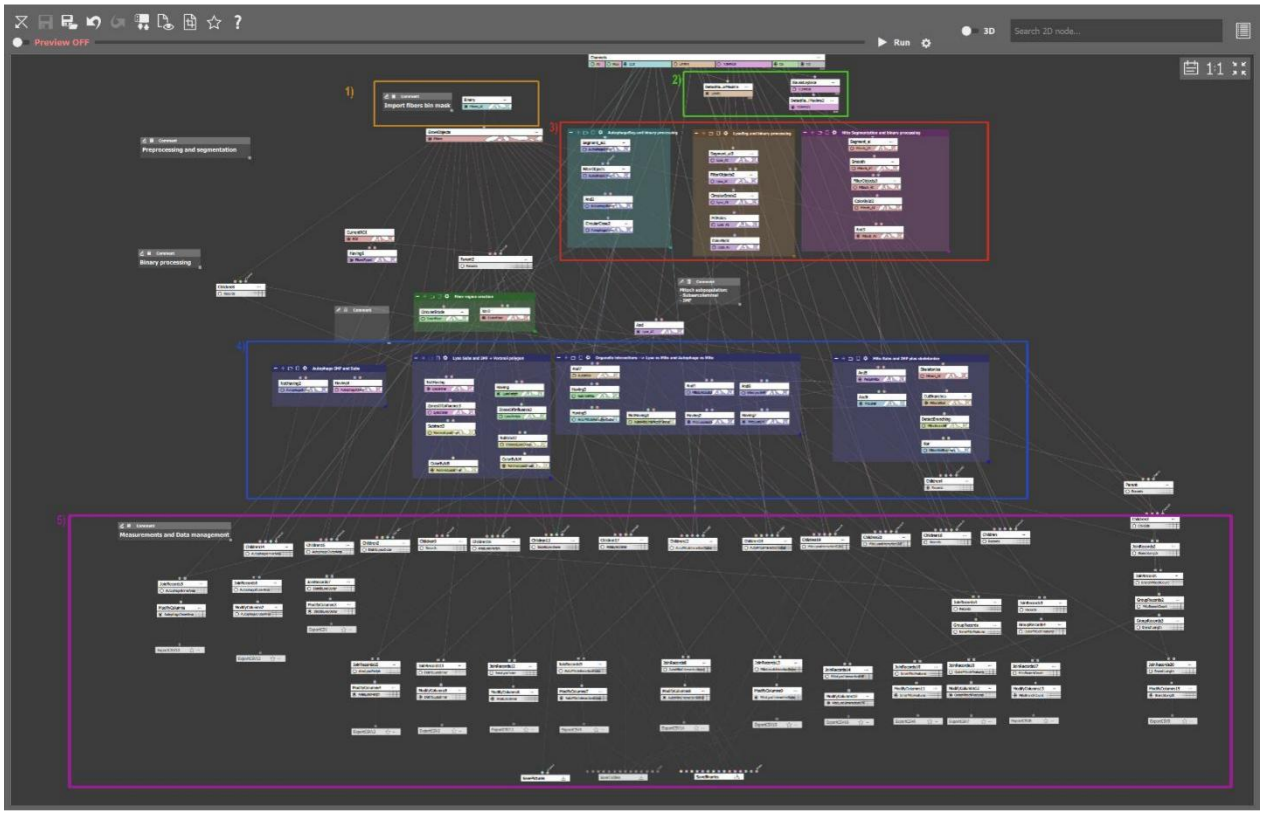
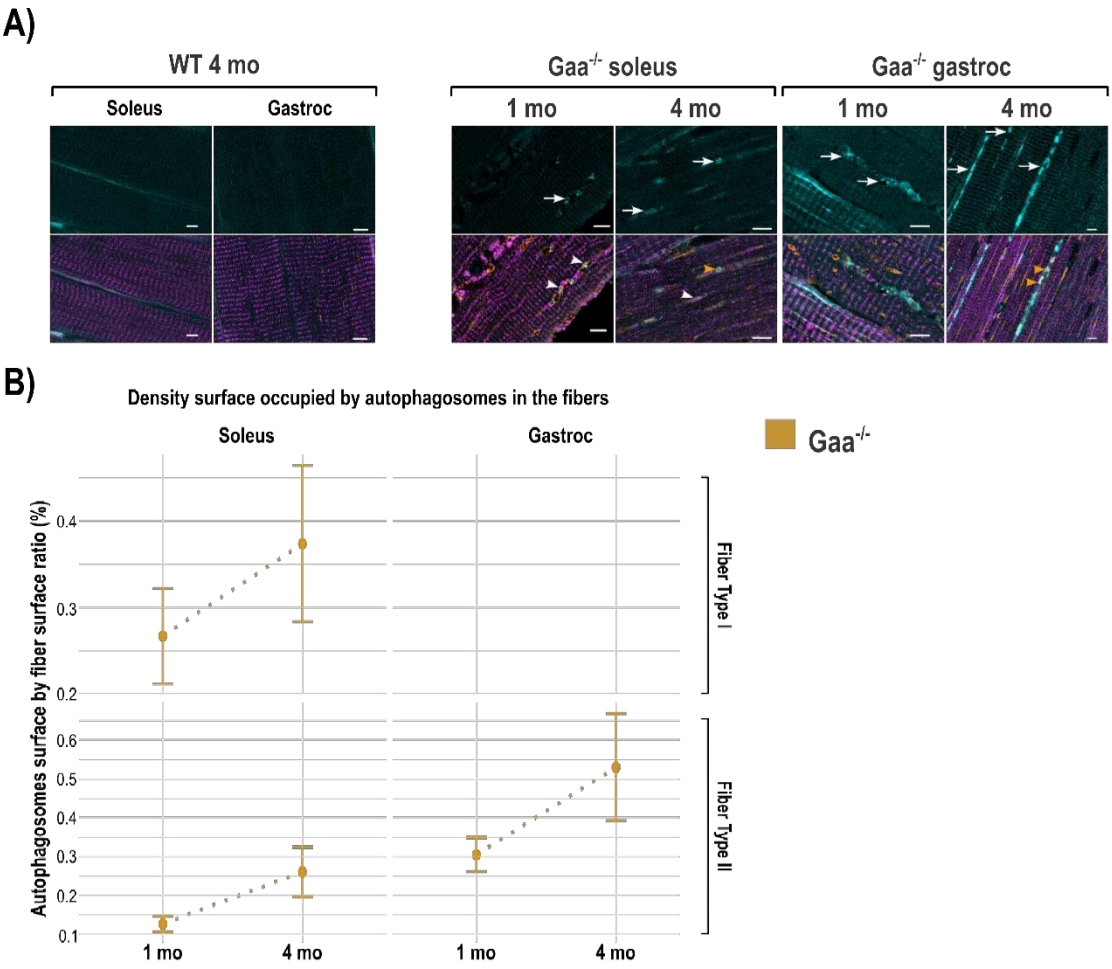


Figure S1: General Analysis 3 (GA3) pipeline for feature extraction of mitochondria, lysosomes, and autophagosomes. The GA3 pipeline was developed to extract and quantify key structural and interaction features of mitochondria, lysosomes, autophagosomes, and mitochondria-lysosome contact sites, using deep learning-based segmentation combined with advanced image processing tools.

1. **Import and preprocessing (orange section):** Binary masks of manually annotated muscle fibers were imported into the workflow.
2. **Contrast enhancement (green section):** Local maxima contrast enhancement was applied to LAMP-1 and TOMM20 signals to improve object detection accuracy.
3. **Segmentation (Red section):**
    - Three U-Net–based deep learning models (Segment.ai) were used to segment autophagosomes, lysosomes, and mitochondria.
    - Additional binary filtering and smoothing steps were applied to refine object boundaries.

4. **Binary operations and object association (blue section):**
    - Autophagosomes were associated with their corresponding fiber regions.
    - Lysosomes were assigned to intermyofibrillar (IMF) or subsarcolemmal (SS) regions, and Voronoi diagrams were generated to assess spatial distribution.
    - Detection of autophagosomes or lysosomes in close vicinity to mitochondria was performed to identify potential interaction sites.
    - Mitochondria were associated with SSM or IMF compartments, followed by binary skeletonization of the complet network to detect and quantify branching points.
5. **Quantifications (Orange Magenta):**
    - Structural metrics included mitochondrial surface area, mitochondrial density per fiber area, and branch point density.
    - Interaction metrics included the number of mitochondria-lysosome contact sites and their spatial distribution.

This integrated pipeline provides a quantitative framework for characterizing organelle architecture and interactions within skeletal muscle fibers.



Supplementary Figure 2. Representative autophagosome structures in skeletal muscle. A) Top: LC3 channel; bottom: LC3 merged with LAMP-1 (lysosomes, orange) and TOMM20 (mitochondria, magenta). In Gaa$^{-/-}$ muscle, autophagic buildup is evident (white arrows). Some autophagic structures are at proximity with lysosomes (orange arrowheads), while others are observed in proximity to both lysosomes and mitochondria (white arrowheads). Scale bar = 5 μm. B) Quantification of autophagosome density, expressed as the surface area occupied within fibers in Gaa$^{-/-}$ mice at 1 and 4 months. No statistically significant differences were detected; however, autophagosome accumulation appeared more pronounced in gastrocnemius and tended to increase with age in both muscles.

Discussion

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis d'explorer deux aspects complémentaires des maladies neuromusculaires : (i) les remodelages du réseau vasculaire et de la MEC dans la DMD et (ii) les altérations mitochondriales et lysosomales dans la maladie de Pompe.

Ces études reposent sur des méthodologies innovantes mêlant transparisation et imagerie 3D multiphotonique, super-résolution et segmentation par *deep learning*. Elles offrent ainsi une vision multi-échelle, intégrée et quantitative des altérations tissulaires et subcellulaires, qui complète les approches histologiques conventionnelles.

Apport de l'analyse 3D de la vascularisation et la fibrose

La DMD est caractérisée par une faiblesse musculaire progressive, associée à une accumulation de MEC et à des anomalies vasculaires *(Duan et al., 2021)*. Une diminution de la densité capillaire *(Loufrani et al., 2004; Nguyen et al., 2005)*, une ischémie fonctionnelle et des ramifications vasculaires anormales ont été décrites *(Latroche et al., 2015)*. Toutefois, ces données reposent essentiellement sur des analyses 2D, qui ne permettent pas de restituer la complexité 3D des réseaux vasculaires et de la fibrose. Dans la section ***V*** de ce manuscrit, nous avons proposé une approche intégrée combinant transparisation, microscopie multiphotonique et analyse 3D automatisée. Le marquage vasculaire a été réalisé à l'aide de la LEL, qui présente à la fois une spécificité pour les cellules endothéliales et une compatibilité optimale avec les solvants organiques utilisés dans les protocoles de transparisation *(Jährling et al., 2009; Robertson et al., 2015).* Contrairement à l'immunomarquage CD31, pénalisé par un faible rapport signal/bruit dans les tissus épais *(Lugo-Hernandez et al., 2017; Qi et al., 2019)* et à la lectine GSL I dont l'affinité est restreinte selon les espèces *(Robertson et al., 2015)*, la LEL constitue un compromis idéal pour une approche multi-espèces.

La mise au point du protocole de transparisation a constitué un élément crucial dans la démarche expérimentale choisie. Le protocole iDISCO+ permet d'obtenir un marquage homogène, mais avec un rapport signal/bruit limité. À l'inverse, le signal est plus net mais le marquage est hétérogène avec le protocole CUBIC (hydrophile). Leur combinaison séquentielle, inspirée de travaux menés sur l'ovaire murin *(McKey et al., 2020),* s'est révélée particulièrement pertinente dans le muscle, permettant d'imager jusqu'à 1,5 mm de profondeur au microscope multiphotonique, soit dix fois plus que les limites habituellement rapportées pour le muscle (150-200 µm, *Rothstein et al., 2005; Schneidereit et al., 2021).* Le muscle squelettique fait partie des tissus pour lesquels la transparisation demeure particulièrement difficile. Dans le cas du muscle dystrophique, cette contrainte est renforcée par la fibrose et les foyers de nécrose, qui accentuent la diffusion et l'absorption de la lumière, limitant ainsi la profondeur d'imagerie *(Burns et al., 2019; Schneidereit et al., 2021).* De ce fait, le développement présenté ici constitue une avancée significative pour l'analyse à grande échelle du muscle pathologique.

La segmentation du réseau vasculaire et des fibres a été réalisée par *deep learning* avec une architecture U-Net *(Ronneberger et al., 2015)*. Ce modèle a été implémenté dans le logiciel NIS-Element. Il intègre une stratégie d'augmentation de données comprenant des transformations affines (flip, rotations) ainsi que des transformations d'intensité (ajustement du gamma), adaptée aux variations de contraste et d'intensité. La fonction de coût a été définie comme une combinaison de la *Dice Loss* et de la *Cross Entropy Loss*, optimisant à la fois le recouvrement spatial entre les prédictions et les masques de référence, tout en intégrant la distribution des structures segmentées. L'association de ces deux fonctions de coût permet en particulier de réduire le déséquilibre de classes, en limitant les erreurs liées à des pixels incorrectement classés comme objet ou arrière-plan *(Taghanaki et al., 2019)*.

Pour la segmentation des fibres, nous avons privilégié une architecture U-Net intégrant une fonctionnalité spécifique permettant de mieux délimiter les objets contigus. Ce modèle est particulièrement sensible aux variations locales, ce qui le rend adapté à la détection des frontières entre fibres adjacentes. Afin de réduire le bruit lié au signal autofluorescent du cytoplasme, tout en préservant la netteté des contours, un filtre médian de taille 3x3 a été appliqué en amont. Cette étape de prétraitement permet d'améliorer la qualité des entrées tout en évitant un lissage excessif susceptible d'effacer les bordures des fibres.

Le choix des images de vérité terrain a été réalisé de manière à inclure un ensemble représentatif d'objets (vaisseaux, fibres) présentant une diversité de morphologies et d'intensités. Cette hétérogénéité est essentielle pour éviter le sur-apprentissage sur un jeu de données trop homogène, qui conduirait à un algorithme moins performant face à des situations nouvelles.

Finalement, l'intégration de ces modèles dans un *pipeline* d'analyse a permis d'extraire des informations quantitatives sur le degré d'atteinte du réseau vasculaire. Certains paramètres, tels que le *sharing factor* ou la surface d'échange entre fibres et vaisseaux, ont pu être implémentés automatiquement pour la 1re fois grâce à des opérations de morphologie mathématique et binaire. Cette approche se distingue des méthodes classiques qui reposaient sur des estimations indirectes issues de calculs géométriques ou stéréologiques *(Hepple and Mathieu-Costello, 2001; Nederveen et al., 2021),* offrant ainsi une mesure plus directe et reproductible de ces interactions tissulaires.

Nos analyses 3D apportent une compréhension nouvelle sur l'organisation vasculaire dans le muscle dystrophique. Contrairement aux études antérieures, essentiellement basées sur des coupes 2D, qui décrivaient une raréfaction vasculaire ou une désorganisation *(Desguerre et al., 2009b; Nguyen et al., 2005),* notre approche 3D révèle deux altérations majeures : (i) une réduction d'environ moitié de la surface de contact entre fibres et microvaisseaux, traduisant une perte d'interfaces fonctionnelles d'échange, et (ii) l'encapsulation d'une proportion significative de vaisseaux dans la matrice fibreuse. Ces résultats suggèrent non seulement une diminution de la perfusion locale, mais aussi un isolement progressif des vaisseaux par le tissu fibreux environnant un phénomène jusqu'ici observé, mais jamais

quantifié en 3D. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une altération conjointe de la perfusion et du remodelage tissulaire, offrant une vision intégrée du couplage entre fibrose et dysfonction vasculaire dans la DMD.

L'imagerie SHG s'est révélée particulièrement adaptée à la caractérisation de la fibrose. Le caractère *label-free* du signal SHG constitue un atout majeur pour l'imagerie du collagène, permettant une détection spécifique sans marquage exogène. Le signal a été collecté principalement en direction *forward*, le canal *backward* présentant un rendement plus faible, comme précédemment rapporté *(Williams et al., 2005)*. L'utilisation d'une lame demi-onde a permis de moduler la polarisation du faisceau incident afin d'explorer la dépendance angulaire du signal, tandis que l'orientation transversale de l'échantillon a permis de minimiser la contribution des bandes de myosine, compte tenu de la dépendance directionnelle du signal SHG *(Rouède et al., 2017, 2013).*

Pour analyser le réseau de collagène, dont la structure se présente dense et complexe, un prétraitement par filtre Laplacien d'un Gaussien a été appliqué afin d'affiner les contours des fibres avant la segmentation basée sur les bords. Cette étape a permis d'améliorer la détection et la reconstruction 3D du collagène fibrillaire. Par ailleurs, l'analyse 3D de la SHG a rapporté une augmentation attendue du volume de collagène, nos données mettent en évidence une morphologie distincte par rapport aux muscles sains, marquée par une organisation plus dense des fibres de collagène. Cette approche révèle ainsi un remodelage qualitatif de la fibrose, difficilement détectable avec les méthodes histologiques classiques en 2D *(Desguerre et al., 2009b; Giovarelli et al., 2022; Hammers et al., 2020).* Nos résultats rejoignent et appuient des observations récentes montrant l'importance de la désorganisation du collagène dans la rigidification du tissu *(Brashear et al., 2021; Dubreil et al., 2023; Pichon et al., 2022)*.

Ces résultats confirment que la fibrose dans la DMD ne correspond pas strictement à une accumulation passive de MEC et qu'elle contribue directement à la rigidification du tissu musculaire par modification conformationnelle de celle-ci, participant à la perte de la fonction contractile du muscle *(Brashear et al., 2021; Desguerre et al., 2009b)*. Cette accumulation de MEC, composée principalement de collagène de type I et III, constitue un processus pathologique dans divers maladies dites fibrosantes *(Akbary et al., 2025; Tandon et al., 2015; Wynn and Ramalingam, 2012)*. L'imagerie 3D basée sur le signal SHG permet d'en extraire des caractéristiques structurales précises parmi lesquelles l'orientation, la densité, la longueur et l'organisation des fibres, offrant la possibilité de définir des marqueurs histologiques quantitatifs. Ces paramètres pourraient être exploités pour le diagnostic précoce, le suivi de la progression ou encore l'évaluation de l'efficacité thérapeutique dans la DMD. Au-delà du muscle, cette approche est transposable à d'autres organes touchés par un processus fibrosant, tels que les poumons, les reins ou le foie. La caractérisation 3D du réseau de collagène développée ici ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour les études précliniques, en fournissant des données essentielles à la compréhension, au diagnostic et, à terme, au traitement des maladies associées à la fibrose.

Désorganisation mitochondriale et lysosomale dans la maladie de Pompe

La maladie de Pompe, due à un déficit en GAA, conduit à une surcharge en glycogène dans les lysosomes et perturbe la biogenèse des mitochondries *(Fukuda et al., 2006a; Reuser et al., 2018)*.

Historiquement, la microscopie électronique a permis de décrire ces anomalies ultrastructurales, incluant accumulation de glycogène, désorganisation des crêtes mitochondriales et vacuoles autophagiques. Toutefois, l'absence de marquage multiparamétrique limitent son application pour une quantification multi-organelle à grande échelle. Dans ce cadre, nous avons exploité l'imagerie super-résolution (NSPARC, résolution ~140 nm) pour analyser simultanément les mitochondries et les lysosomes dans les muscles soléaire et gastrocnémien de souris saines et $Gaa^{-/-}$, aux âges de 1 et 4 mois. Contrairement aux autres approches de super-résolution que sont le STED et SMLM, l'approche NSPARC possède un champ d'acquisition large sur le tissu pour acquérir plusieurs évènements simultanément. De plus, elle est moins limitée en profondeur que pourrait l'être le SIM ou le STED. Ces caractéristiques en font une approche particulièrement adaptée à l'étude de structures subcellulaires dans des tissus diffusant comme le muscle.

Nous avons démontré qu'une annotation via le Plugin Weka dans Fiji permettait de gagner en précision et de générer un modèle de segmentation précis. Cette méthode d'annotation assistée pourrait être implémentée dans NIS afin d'augmenter encore la précision et de diminuer les étapes.

Nos résultats montrent la présence d'anomalies mitochondriales différentielles selon l'âge et le type de fibres. À 4 mois, une densité accrue de mitochondries désorganisées est observée, particulièrement marquée dans le muscle *Soléaire*, mais non significative dans le muscle *Gastrocnémien*. Nous avons également montré que certains réseaux mitochondriaux présentaient un aspect anormal, voire gonflé, possiblement lié à l'accumulation de débris intra-mitochondriaux, comme déjà décrit *(Lewandowska et al., 2008; Raben et al., 2012).* En parallèle, nos analyses quantitatives ont mis en évidence une augmentation progressive de la taille et de la surface occupé par les lysosomes et les vacuoles autophagiques. Ces résultats concordent avec les données obtenues chez les patients et dans divers modèles murins *(Fukuda et al., 2006b; Raben et al., 2008, 2000; Shea and Raben, 2009)*. L'axe mitochondrie-lysosome est défini comme un élément clé de l'homéostasie cellulaire. En effet, des études en super-résolution menées sur des cellules HeLa ont montré que les contacts mitochondrie-lysosome se forment à proximité immédiate des sites de fission mitochondriale et régulent ce processus via l'hydrolyse de RAB7-GTP *(Wong et al., 2018)*. Nous avons montré qu'il y a une augmentation significative de ces contacts dans le muscle, consolidant par un nouvel abord exploratoire l'idée selon laquelle une dérégulation des mécanismes de fission existe dans la maladie de Pompe.

Identification de limitations dans le déploiement d'approches exploratoires

Bien que nos approches aient permis d'accéder à des informations importantes sur les deux maladies étudiées, certaines limites identifiées dans les modalités exploratoires peuvent être ici

mentionnées. En regard de ses avantages que représentent la profondeur de pénétration et l'exploitation des signaux endogènes comme la SHG et la THG, la microscopie multiphotonique est aussi caractérisée par sa nature de balayage point par point. Ceci constitue clairement un point limitant dans le sens où elle réduit la vitesse d'acquisition et complique l'imagerie d'échantillons volumineux.

Concernant la segmentation, les approches de *deep learning* surpassent les méthodes classiques de seuillage. Dans notre *pipeline*, elles ont permis une détection précise des fibres, vaisseaux et mitochondries. Toutefois, la qualité et la diversité du jeu de données de vérité terrain restent déterminantes, car elles conditionnent directement la performance et la capacité de généralisation du modèle. À cet égard, des initiatives comme The BioImage Archive (BIA) pourraient à l'avenir fournir des bases de données de référence et renforcer la robustesse de ces approches.

Une autre limite identifiée réside dans l'annotation manuelle qui s'avère être chronophage, sujette à erreurs et nécessitant souvent l'expertise d'opérateurs. La complexité des images de fluorescence, rencontrée en raison de marquages multiples, d'intensités variables et d'ambiguïtés structurelles, accroît ce risque d'erreur et peut conduire à des annotations partielles ou inexactes.

D'autres part, l'accès à des ressources de calcul adaptées reste aujourd'hui un frein, même si cela tend à s'atténuer avec les optimisations récentes des architectures, la mise à disposition de supercalculateurs, ainsi qu'avec des initiatives comme ZeroCostDL4Mic, qui offre l'accès via le cloud à de nombreux modèles de *deep learning* dédiés à la microscopie.

Enfin, il est à noter que les informations extraites de notre analyse sur les mitochondries se limitent à la morphologie et aux interactions observées sur des tissus fixés. Une approche complémentaire en imagerie *in vivo*, sur des fibres isolées ou des fibroblastes en culture, pourraient permettre d'accéder à des données dynamiques et fonctionnelles, offrant ainsi une compréhension plus complète des mécanismes mitochondriaux altérés dans la maladie de Pompe.

Perspectives translationnelles

Les méthodologies mises en place lors de ce travail expérimental ont contribué à l'identification de nouveaux marqueurs morphologiques qui sont directement transposables à l'évaluation thérapeutique dans le sens où l'angiogenèse et la fibrose sont des cibles de différentes stratégies nouvellement positionnées. Ainsi, dans la DMD, des études menées dans le modèle murin *mdx* ont montré que l'augmentation du facteur de croissance endothéliale VEGF, obtenue par inhibition du récepteur tyrosine kinase Flt-1, stimule l'angiogenèse, améliore le flux sanguin et contribue à une meilleure fonction contractile *(Verma et al., 2010)*. Plus récemment, des travaux ont confirmé que cette stimulation vasculaire pouvait s'accompagner d'une réduction significative de l'accumulation de fibrose, suggérant une interaction étroite entre perfusion et remodelage matriciel *(Bosco et al., 2021; Verma et al., 2019)*. Sur le plan de la fibrose, plusieurs voies moléculaires constituent aujourd'hui des cibles privilégiées. Parmi elles,

la lysyl oxydase (LOX), enzyme clé dans la réticulation et la stabilisation des fibres de collagène, dont l'inhibition pourrait réduire la rigidification du tissu *(Brashear et al., 2022; Smith et al., 2016)*. Certaines métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont également étudiés comme biomarqueurs de la progression de la fibrose et comme cibles thérapeutiques potentielles *(Fukushima et al., 2007; Kumar et al., 2010; Miyazaki et al., 2011; Ogura et al., 2014)*.

Dans la maladie de Pompe, l'imagerie super-résolution et le *deep learning* permettent une quantification de la morphologie mitochondriale et des contacts mitochondrie-lysosome. Les paramètres définis dans ce travail pourraient venir compléter les analyses principalement biochimiques exploitées aujourd'hui pour caractériser le déficit métabolique qui caractérise la maladie. L'enzymothérapie substitutive (ERT), reposant sur l'administration de GAA recombinante (rhGAA), est aujourd'hui le traitement délivré au patient atteint de la maladie de Pompe. Bien qu'elle permette de réduire partiellement l'accumulation de glycogène dans les lysosomes, son efficacité reste limitée, notamment concernant la restauration des fonctions musculaires à long terme. C'est la raison pour laquelle il est envisagé le développement d'approches combinées, incluant notamment l'exercice physique ou des molécules pharmacologiques dont la finalité est de stimuler la biogenèse mitochondriale *(Ashe et al., 2010; Nilsson et al., 2015).* En cela, les outils mis en lumière dans ce travail expérimental pourraient s'avérer particulièrement utiles pour qualifier l'impact de ces nouvelles approches sur le remodelage du tissu musculaire.

Conclusion et perspectives

L'ensemble des travaux réalisés durant cette thèse démontre la pertinence des approches d'imagerie multimodale et de super-résolution, couplées à des analyses avancées par *deep learning*, dans le but de décrypter les altérations multi-échelles du muscle squelettique.

À l'échelle tissulaire, nous avons révélé la présence de remodelages du réseau vasculaire et de la fibrose dans la DMD, mettant en évidence en 3D des perturbations des interfaces fonctionnelles entre fibres et micro-vaisseaux. À l'échelle subcellulaire, l'étude de la maladie de Pompe a permis de cartographier avec précision les atteintes mitochondriales et lysosomales ainsi que leurs interactions, ouvrant une nouvelle voie d'analyse morphologique et fonctionnelle des mécanismes pathologiques.

Au-delà de ces résultats, la démarche déployée illustre la capacité à analyser et associer des structures complexes telles que vaisseaux, fibres musculaires et fibrose et à en extraire des informations morphologiques et interactionnelles inédites. L'implémentation de modèles de segmentation basés sur le *deep learning* a par ailleurs permis la détection précise de structures d'intérêt, qu'il s'agisse de mitochondries ou de fibres musculaires (même en l'absence de marquage membranaire). Ces outils offrent ainsi un potentiel d'application bien au-delà des modèles étudiés. Les résultats obtenus démontrent les capacités du GA3 et du module NSPARC à devenir des plateformes intégrées d'analyse morphologique multi-échelle. De plus, l'implémentation amorcée de la microscopie corrélative (non présentée ici) ouvre la perspective d'une combinaison multimodale associant imagerie multiphotonique et super-résolution, s'inscrivant dans une démarche de "smart microscopy" via le module Jobs.

Un défi central de cette intégration réside dans la définition d'un système de coordonnées commun, capable de relier des acquisitions issues de modalités différentes, présentant des résolutions, des contrastes et des échelles spatiales hétérogènes. Au cours des essais menés, les billes fluorescentes de 4 µm ont montré leurs limites dans les échantillons épais, du fait de l'atténuation du signal et de l'imprécision de leur localisation. Dans des coupes plus fines, des repères morphologiques endogènes peuvent être exploités, mais au prix d'une précision réduite et d'une dépendance accrue au jugement de l'opérateur. Pour dépasser ces limites, plusieurs pistes méthodologiques peuvent être envisagées. Les approches de *down-sampling* et d'*up-sampling* permettent d'harmoniser la taille des voxels entre les modalités. Des algorithmes de recalage non rigide, capables de corriger les déformations locales induites par la préparation des échantillons, constituent un atout supplémentaire. Enfin, des environnements open source comme eC-CLEM *(Paul-Gilloteaux et al., 2017),* développés initialement pour la corrélation entre microscopie électronique et photonique, offrent un cadre conceptuel adaptable à l'intégration des imageries multiphotonique et en super-résolution.

Références bibliographiques

Adams, M.W., Loftus, A.F., Dunn, S.E., Joens, M.S., Fitzpatrick, J.A.J., 2015. Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM). CP Cytometry 71. https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1237s71

Adhihetty, P.J., Ljubicic, V., Menzies, K.J., Hood, D.A., 2005. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. American Journal of Physiology-Cell Physiology 289, C994–C1001. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00031.2005

Akbary, K., Noureddin, M., Yayun, R., Tai, D., Boudes, P., 2025. Development of AI Based Fibrosis Detection Algorithm by SHG/TPEF Microscopy for Fully Quantified Liver Fibrosis Assessment in MASH. Liver International 45, e70258. https://doi.org/10.1111/liv.70258

Allen, D.G., Lamb, G.D., Westerblad, H., 2008. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. Physiological Reviews 88, 287–332. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007

Allen, D.G., Whitehead, N.P., Froehner, S.C., 2016. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca^{2+}, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. Physiological Reviews 96, 253–305. https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2015

Almagro, J., Messal, H.A., Zaw Thin, M., Van Rheenen, J., Behrens, A., 2021. Tissue clearing to examine tumour complexity in three dimensions. Nat Rev Cancer 21, 718–730. https://doi.org/10.1038/s41568-021-00382-w

Altendorf, H., Decencière, E., Jeulin, D., Peixoto, P.D.S., Deniset-Besseau, A., Angelini, E., Mosser, G., Schanne-Klein, M.-C., 2012. Imaging and 3D morphological analysis of collagen fibrils: Imaging and morphological analysis of collagen fibrils. Journal of Microscopy 247, 161–175. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03629.x

Ashe, K.M., Taylor, K.M., Chu, Q., Meyers, E., Ellis, A., Jingozyan, V., Klinger, K., Finn, P.F., Cooper, C.G.F., Chuang, W.-L., Marshall, J., McPherson, J.M., Mattaliano, R.J., Cheng, S.H., Scheule, R.K., Moreland, R.J., 2010. Inhibition of glycogen biosynthesis via mTORC1 suppression as an adjunct therapy for Pompe disease. Molecular Genetics and Metabolism 100, 309–315. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.05.001

Au, Y., 2004. The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 61, 3016–3033. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4282-x

Baggett, D.W., Medyukhina, A., Tripathi, S., Shirnekhi, H.K., Wu, H., Pounds, S.B., Khairy, K., Kriwacki, R., 2022. An Image Analysis Pipeline for Quantifying the Features of Fluorescently-Labeled Biomolecular Condensates in Cells. Front. Bioinform. 2, 897238. https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.897238

Bancelin, S., Couture, C.-A., Pinsard, M., Rivard, M., Drapeau, P., Légaré, F., 2017. Probing microtubules polarity in mitotic spindles in situ using Interferometric Second Harmonic Generation Microscopy. Sci Rep 7, 6758. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06648-4

Barron, J.T., 2020. A Generalization of Otsu's Method and Minimum Error Thresholding. https://doi.org/10.48550/arXiv.2007.07350

Barzda, V., Greenhalgh, C., Aus Der Au, J., Elmore, S., Hgm Van Beek, J., Squier, J., 2005. Visualization of mitochondria in cardiomyocytes. Opt. Express 13, 8263. https://doi.org/10.1364/OPEX.13.008263

Bates, M., Jones, S.A., Zhuang, X., 2013. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM): A Method for Superresolution Fluorescence Imaging. Cold Spring Harb Protoc 2013, pdb.top075143. https://doi.org/10.1101/pdb.top075143

Bauer, R., Straub, V., Blain, A., Bushby, K., MacGowan, G.A., 2009. Contrasting effects of steroids and angiotensin-converting-enzyme inhibitors in a mouse model of dystrophin-deficient cardiomyopathy. European J of Heart Fail 11, 463–471. https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfp028

Bell, R.A.V., Al-Khalaf, M., Megeney, L.A., 2016. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. Skeletal Muscle 6, 16. https://doi.org/10.1186/s13395-016-0086-6

Berridge, B.R., Bolon, B., Herman, E., 2018. Skeletal Muscle System, in: Fundamentals of Toxicologic Pathology. Elsevier, pp. 195–212. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809841-7.00010-1

Berta, B., Tordai, H., Lukács, G.L., Papp, B., Enyedi, Á., Padányi, R., Hegedűs, T., 2024. SARS-CoV-2 envelope protein alters calcium signaling via SERCA interactions. Sci Rep 14, 21200. https://doi.org/10.1038/s41598-024-71144-5

Bertolin, G., Bulteau, A.-L., Alves-Guerra, M.-C., Burel, A., Lavault, M.-T., Gavard, O., Le Bras, S., Gagné, J.-P., Poirier, G.G., Le Borgne, R., Prigent, C., Tramier, M., 2018. Aurora kinase A localises to mitochondria to control organelle dynamics and energy production. eLife 7, e38111. https://doi.org/10.7554/eLife.38111

Bertolin, G., Sizaire, F., Herbomel, G., Reboutier, D., Prigent, C., Tramier, M., 2016. A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. Nat Commun 7, 12674. https://doi.org/10.1038/ncomms12674

Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H.F., 2006. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. Science 313, 1642–1645. https://doi.org/10.1126/science.1127344

Bianchini, P., Diaspro, A., 2008. Three-dimensional (3D) backward and forward second harmonic generation (SHG) microscopy of biological tissues. Journal of Biophotonics 1, 443–450. https://doi.org/10.1002/jbio.200810060

Bichat, X., 1801. Anatomie générale: appliquée à la physiologie et à la médecine.

Blacker, T.S., Duchen, M.R., 2016. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. Free Radical Biology and Medicine 100, 53–65. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010

Blanc, H., Kaddour, G., David, N.B., Supatto, W., Livet, J., Beaurepaire, E., Mahou, P., 2023. Chromatically Corrected Multicolor Multiphoton Microscopy. ACS Photonics 10, 4104–4111. https://doi.org/10.1021/acsphotonics.3c01104

Blau, H.M., Webster, C., Pavlath, G.K., 1983. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4856–4860. https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4856

Bleck, C.K.E., Kim, Y., Willingham, T.B., Glancy, B., 2018. Subcellular connectomic analyses of energy networks in striated muscle. Nat Commun 9, 5111. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07676-y

Bonilla, E., Samitt, C.E., Miranda, A.F., Hays, A.P., Salviati, G., DiMauro, S., Kunkel, L.M., Hoffman, E.P., Rowland, L.P., 1988. Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. Cell 54, 447–452. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90065-7

Bosco, J., Zhou, Z., Gabriëls, S., Verma, M., Liu, N., Miller, B.K., Gu, S., Lundberg, D.M., Huang, Y., Brown, E., Josiah, S., Meiyappan, M., Traylor, M.J., Chen, N., Asakura, A., De Jonge, N., Blanchetot, C., de Haard, H., Duffy, H.S., Keefe, D., 2021. VEGFR-1/Flt-1 inhibition increases angiogenesis and improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development 21, 369–381. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.013

Botella, J., Schytz, C.T., Pehrson, T.F., Hokken, R., Laugesen, S., Aagaard, P., Suetta, C., Christensen, B., Ørtenblad, N., Nielsen, J., 2023. Increased mitochondrial surface area and cristae density in the skeletal muscle of strength athletes. The Journal of Physiology 601, 2899–2915. https://doi.org/10.1113/JP284394

Brashear, S.E., Wohlgemuth, R.P., Gonzalez, G., Smith, L.R., 2021. Passive stiffness of fibrotic skeletal muscle in *mdx* mice relates to collagen architecture. J Physiol 599, 943–962. https://doi.org/10.1113/JP280656

Brashear, S.E., Wohlgemuth, R.P., Hu, L.-Y., Jbeily, E.H., Christiansen, B.A., Smith, L.R., 2022. Collagen cross-links scale with passive stiffness in dystrophic mouse muscles, but are not altered with administration of a lysyl oxidase inhibitor. PLoS ONE 17, e0271776. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271776

Brown, M., Szeliski, R., Winder, S., 2005. Multi-Image Matching Using Multi-Scale Oriented Patches, in: 2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05). Presented at the 2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05), IEEE, San Diego, CA, USA, pp. 510–517. https://doi.org/10.1109/CVPR.2005.235

Bucana, C., Hoyer, L.C., Hobbs, B., Breesman, S., McDaniel, M., Hanna, M.G., Jr., 1976. Morphological Evidence for the Translocation of Lysosomal Organelles from Cytotoxic Macrophages into the Cytoplasm of Tumor Target Cells1. Cancer Research 36, 4444–4458.

Bugarski, M., Martins, J.R., Haenni, D., Hall, A.M., 2018. Multiphoton imaging reveals axial differences in metabolic autofluorescence signals along the kidney proximal tubule. American Journal of Physiology-Renal Physiology 315, F1613–F1625. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00165.2018

Burns, D.P., Drummond, S.E., Bolger, D., Coiscaud, A., Murphy, K.H., Edge, D., O'Halloran, K.D., 2019. N-acetylcysteine Decreases Fibrosis and Increases Force-Generating Capacity of mdx Diaphragm. Antioxidants 8, 581. https://doi.org/10.3390/antiox8120581

Bushby, K.M.D., 1992. Genetic and clinical correlations of Xp21 muscular dystrophy. J of Inher Metab Disea 15, 551–564. https://doi.org/10.1007/BF01799614

Buttafava, M., Villa, F., Castello, M., Tortarolo, G., Conca, E., Sanzaro, M., Piazza, S., Bianchini, P., Diaspro, A., Zappa, F., Vicidomini, G., Tosi, A., 2020. SPAD-based asynchronous-readout array detectors for image-scanning microscopy. Optica 7, 755. https://doi.org/10.1364/optica.391726

Cardona, A., Saalfeld, S., Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Preibisch, S., Longair, M., Tomancak, P., Hartenstein, V., Douglas, R.J., 2012. TrakEM2 Software for Neural Circuit Reconstruction. PLoS ONE 7, e38011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038011

Cardullo, R.A., Hinchcliffe, E.H., 2013. Chapter 12 - Post-Processing for Statistical Image Analysis in Light Microscopy, in: Sluder, G., Wolf, D.E. (Eds.), Methods in Cell Biology. Academic Press, pp. 285–315. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407761-4.00012-9

Castanha, N., Challois, S., Grenier, D., Le-Bail, P., Dubreil, L., Lucas, T., 2023. Multiphoton microscopy is a nondestructive label-free approach to investigate the 3D structure of gas cell walls in bread dough. Sci Rep 13, 13971. https://doi.org/10.1038/s41598-023-39797-w

Castello, M., Tortarolo, G., Buttafava, M., Deguchi, T., Villa, F., Koho, S., Pesce, L., Oneto, M., Pelicci, S., Lanzanó, L., Bianchini, P., Sheppard, C.J.R., Diaspro, A., Tosi, A., Vicidomini, G., 2019. A robust and versatile platform for image scanning microscopy enabling super-resolution FLIM. Nat Methods 16, 175–178. https://doi.org/10.1038/s41592-018-0291-9

Centonze, V.E., White, J.G., 1998. Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. Biophysical Journal 75, 2015–2024. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77643-X

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasherf, D.C., 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression 263.

Chan, D.C., 2020. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 15, 235–259. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711

Chargé, S.B.P., Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. Physiological Reviews 84, 209–238. https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2003

Chatzinikita, E., Maridaki, M., Palikaras, K., Koutsilieris, M., Philippou, A., 2023. The Role of Mitophagy in Skeletal Muscle Damage and Regeneration. Cells 12, 716. https://doi.org/10.3390/cells12050716

Chen, B.-C., Legant, W.R., Wang, K., Shao, L., Milkie, D.E., Davidson, M.W., Janetopoulos, C., Wu, X.S., Hammer, J.A., Liu, Z., English, B.P., Mimori-Kiyosue, Y., Romero, D.P., Ritter, A.T., Lippincott-Schwartz, J., Fritz-Laylin, L., Mullins, R.D., Mitchell, D.M., Bembenek, J.N., Reymann, A.-C., Böhme, R., Grill, S.W., Wang, J.T., Seydoux, G., Tulu, U.S., Kiehart, D.P., Betzig, E., 2014. Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. Science 346. https://doi.org/10.1126/science.1257998

Chen, Q., Fang, H., Shao, X., Tian, Z., Geng, S., Zhang, Y., Fan, H., Xiang, P., Zhang, J., Tian, X., Zhang, K., He, W., Guo, Z., Diao, J., 2020. A dual-labeling probe to track functional mitochondria–lysosome interactions in live cells. Nat Commun 11, 6290. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20067-6

Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., Looger, L.L., Svoboda, K., Kim, D.S., 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. Nature 499, 295–300. https://doi.org/10.1038/nature12354

Chu, S.-W., Chen, I.-H., Liu, T.-M., Chen, P.C., Sun, C.-K., Lin, B.-L., 2001. Multimodal nonlinear spectral microscopy based on a femtosecond Cr:forsterite laser. Opt. Lett. 26, 1909. https://doi.org/10.1364/OL.26.001909

Chung, K., Wallace, J., Kim, S.-Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., Pak, S., Bernstein, H., Ramakrishnan, C., Grosenick, L., Gradinaru, V., Deisseroth, K., 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature 497, 332–337. https://doi.org/10.1038/nature12107

Cicchi, R., Vogler, N., Kapsokalyvas, D., Dietzek, B., Popp, J., Pavone, F.S., 2013. From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy. Journal of Biophotonics 6, 129–142. https://doi.org/10.1002/jbio.201200092

Cohen, J.S., Fox, T.D., 2001. Expression of green fluorescent protein from a recoded gene inserted into Saccharomyces cerevisiae mitochondrial DNA.

Costantini, I., Cicchi, R., Silvestri, L., Vanzi, F., Pavone, F.S., 2019. In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review. Biomed. Opt. Express 10, 5251. https://doi.org/10.1364/BOE.10.005251

Curry, J.W., Hohl, R., Noakes, T.D., Kohn, T.A., 2012. High oxidative capacity and type IIx fibre content in springbok and fallow deer skeletal muscle suggest fast sprinters with a resistance to fatigue. Journal of Experimental Biology jeb.073684. https://doi.org/10.1242/jeb.073684

Daniel, J., Rose, J.T.A., Vinnarasi, F.S.F., Rajinikanth, V., 2022. VGG-UNet/VGG-SegNet Supported Automatic Segmentation of Endoplasmic Reticulum Network in Fluorescence Microscopy Images. Scanning 2022, 1–11. https://doi.org/10.1155/2022/7733860

Daniel, M., Dubreil, L., Fleurisson, R., Judor, J.-P., Bresson, T., Brouard, S., Favier, A., Charreyre, M.-T., Conchon, S., 2020. Multiscale fluorescent tracking of immune cells in the liver with a highly biocompatible far-red emitting polymer probe. Sci Rep 10, 17546. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74621-9

David, G., Faure, E., 2025. End-to-end 3D instance segmentation of synthetic data and embryo microscopy images with a 3D Mask R-CNN. Front. Bioinform. 4. https://doi.org/10.3389/fbinf.2024.1497539

Débarre, D., Olivier, N., Supatto, W., Beaurepaire, E., 2014. Mitigating Phototoxicity during Multiphoton Microscopy of Live Drosophila Embryos in the 1.0–1.2 µm Wavelength Range. PLoS ONE 9, e104250. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104250

Débarre, D., Supatto, W., Pena, A.-M., Fabre, A., Tordjmann, T., Combettes, L., Schanne-Klein, M.-C., Beaurepaire, E., 2006. Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. Nat Methods 3, 47–53. https://doi.org/10.1038/nmeth813

Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W., 1990. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. Science 248, 73–76. https://doi.org/10.1126/science.2321027

Desguerre, I., Mayer, M., Barbet, J.-P., Romain K. Gherardi, Gherardi, R.K., Christo Christov, Christov, C., 2009a. Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 68, 762–773. https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181aa31c2

Desguerre, I., Mayer, M., Leturcq, F., Barbet, J.-P., Gherardi, R.K., Christov, C., 2009b. Endomysial Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy: A Marker of Poor Outcome Associated With Macrophage Alternative Activation. J Neuropathol Exp Neurol 68, 762–773. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181aa31c2

DeWalt, E.L., Sullivan, S.Z., Schmitt, P.D., Muir, R.D., Simpson, G.J., 2014. Polarization-Modulated Second Harmonic Generation Ellipsometric Microscopy at Video Rate. Anal. Chem. 86, 8448–8456. https://doi.org/10.1021/ac502124v

Dickie, R., Bachoo, R.M., Rupnick, M.A., Dallabrida, S.M., DeLoid, G.M., Lai, J., DePinho, R.A., Rogers, R.A., 2006. Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy. Microvascular Research 72, 20–26. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2006.05.003

Disatnik, M.-H., Dhawan, J., Yu, Y., Beal, M.F., Whirl, M.M., Franco, A.A., Rando, T.A., 1998. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: Studies of the pre-necrotic state. Journal of the Neurological Sciences 161, 77–84. https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00258-5

Dodt, H.-U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgänsberger, W., Becker, K., 2007. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. Nat Methods 4, 331–336. https://doi.org/10.1038/nmeth1036

Dowling, P., Zweyer, M., Swandulla, D., Ohlendieck, K., 2019. Characterization of Contractile Proteins from Skeletal Muscle Using Gel-Based Top-Down Proteomics. Proteomes 7, 25. https://doi.org/10.3390/proteomes7020025

Drobizhev, M., Makarov, N.S., Tillo, S.E., Hughes, T.E., Rebane, A., 2012. Describing Two-Photon Absorptivity of Fluorescent Proteins with a New Vibronic Coupling Mechanism. J. Phys. Chem. B 116, 1736–1744. https://doi.org/10.1021/jp211020k

Drobizhev, M., Tillo, S., Makarov, N.S., Hughes, T.E., Rebane, A., 2009. Absolute Two-Photon Absorption Spectra and Two-Photon Brightness of Orange and Red Fluorescent Proteins. J. Phys. Chem. B 113, 855–859. https://doi.org/10.1021/jp8087379

Duan, D., Goemans, N., Takeda, S., Mercuri, E., Aartsma-Rus, A., 2021. Duchenne muscular dystrophy.

Duboc, D., Meune, C., Pierre, B., Wahbi, K., Eymard, B., Toutain, A., Berard, C., Vaksmann, G., Weber, S., Bécane, H.-M., 2007. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. American Heart Journal 154, 596–602. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.05.014

Dubreil, L., Damane, N., Fleurisson, R., Charrier, M., Pichon, J., Leroux, I., Schleder, C., Ledevin, M., Larcher, T., Jamme, F., Puentes, J., Rouger, K., 2023. Specific and label-free endogenous signature of dystrophic muscle by Synchrotron deep ultraviolet radiation. Sci Rep 13, 10808. https://doi.org/10.1038/s41598-023-37762-1

Dubreil, L., Leroux, I., Ledevin, M., Schleder, C., Lagalice, L., Lovo, C., Fleurisson, R., Passemard, S., Kilin, V., Gerber-Lemaire, S., Colle, M.-A., Bonacina, L., Rouger, K., 2017. Multi-harmonic Imaging in the Second Near-Infrared Window of Nanoparticle-Labeled Stem Cells as a Monitoring Tool in Tissue Depth. ACS Nano 11, 6672–6681. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00773

Dumont, N.A., Bentzinger, C.F., Sincennes, M., Rudnicki, M.A., 2015. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration, in: Terjung, R. (Ed.), Comprehensive Physiology. Wiley, pp. 1027–1059. https://doi.org/10.1002/cphy.c140068

Dumur, T., Duncan, S., Graumann, K., Desset, S., Randall, R.S., Mittelsten Scheid, O., Bass, H.W., Prodanov, D., Tatout, C., Baroux, C., 2019. Probing the 3D architecture of the plant nucleus with microscopy approaches: challenges and solutions. Nucleus 10, 181–212. https://doi.org/10.1080/19491034.2019.1644592

Dunst, S., Tomancak, P., 2019. Imaging Flies by Fluorescence Microscopy: Principles, Technologies, and Applications. Genetics 211, 15–34. https://doi.org/10.1534/genetics.118.300227

Durel, B., Kervrann, C., Bertolin, G., 2021. Quantitative dSTORM super-resolution microscopy localizes Aurora kinase A/AURKA in the mitochondrial matrix. Biology of the Cell 113, 458–473. https://doi.org/10.1111/boc.202100021

Eggeling, C., Willig, K.I., Sahl, S.J., Hell, S.W., 2015. Lens-based fluorescence nanoscopy. Quart. Rev. Biophys. 48, 178–243. https://doi.org/10.1017/s0033583514000146

Elliott, A.D., 2020. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. CP Cytometry 92, e68. https://doi.org/10.1002/cpcy.68

Ellis, C.G., Jagger, J., Sharpe, M., 2005. The microcirculation as a functional system. Crit Care 9, S3. https://doi.org/10.1186/cc3751

Ervasti, J., Campbell, K., 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. The Journal of cell biology 122, 809–823. https://doi.org/10.1083/jcb.122.4.809

Exeter, D., Connell, D., 2010. Skeletal Muscle: Functional Anatomy and Pathophysiology. Semin Musculoskelet Radiol 14, 097–105. https://doi.org/10.1055/s-0030-1253154

Fabre, L., Rousset, C., Monier, K., Da Cruz-Boisson, F., Bouvet, P., Charreyre, M.-T., Delair, T., Fleury, E., Favier, A., 2022. Fluorescent Polymer-AS1411-Aptamer Probe for dSTORM Super-Resolution Imaging of Endogenous Nucleolin. Biomacromolecules 23, 2302–2314. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01706

Fathima, A., Quintana-Cataño, C.A., Heintze, C., Schlierf, M., 2021. Precision of fiducial marker alignment for correlative super-resolution fluorescence and transmission electron microscopy. Discov Mater 1, 11. https://doi.org/10.1007/s43939-021-00011-1

Feng Ning, Delhomme, D., LeCun, Y., Piano, F., Bottou, L., Barbano, P.E., 2005. Toward automatic phenotyping of developing embryos from videos. IEEE Trans. on Image Process. 14, 1360–1371. https://doi.org/10.1109/tip.2005.852470

Fernández, R., Fernández, J.M., Cervera, C., Teijeira, S., Teijeiro, A., Domínguez, C., Navarro, C., 1999. Adult glycogenosis II with paracrystalline mitochondrial inclusions and Hirano bodies in skeletal muscle. Neuromuscular Disorders 9, 136–143. https://doi.org/10.1016/S0960-8966(98)00117-5

Ferreira, R., Vitorino, R., Alves, R.M.P., Appell, H.J., Powers, S.K., Duarte, J.A., Amado, F., 2010. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. Proteomics 10, 3142–3154. https://doi.org/10.1002/pmic.201000173

Fiolka, R., Shao, L., Rego, E.H., Davidson, M.W., Gustafsson, M.G.L., 2012. Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 5311–5315. https://doi.org/10.1073/pnas.1119262109

Fokkema, J., Fermie, J., Liv, N., Van Den Heuvel, D.J., Konings, T.O.M., Blab, G.A., Meijerink, A., Klumperman, J., Gerritsen, H.C., 2018. Fluorescently Labelled Silica Coated Gold Nanoparticles as Fiducial Markers for Correlative Light and Electron Microscopy. Sci Rep 8, 13625. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31836-1

Frangi, A.F., Niessen, W.J., Vincken, K.L., Viergever, M.A., 1998. Multiscale vessel enhancement filtering, in: Wells, W.M., Colchester, A., Delp, S. (Eds.), Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention — MICCAI'98, Lecture Notes in Computer Science. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 130–137. https://doi.org/10.1007/BFb0056195

Franks, J., Wallace, C.T., Shibata, M., Suga, M., Erdman, N., Stolz, D.B., Watkins, S.C., 2017. Correlative Fluorescence and Electron Microscopy in 3D—Scanning Electron Microscope Perspective. CP Cytometry 80. https://doi.org/10.1002/cpcy.18

Frey, T.G., Mannella, C.A., 2000. The internal structure of mitochondria. Trends in Biochemical Sciences 25, 319–324. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1

Fridén, J., Seger, J., Ekblom, B., 1989. Topographical localization of muscle glycogen: an ultrahistochemical study in the human vastus lateralis. Acta Physiologica Scandinavica 135, 381–391. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1989.tb08591.x

Frontera, W.R., Ochala, J., 2015. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. Calcif Tissue Int 96, 183–195. https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y

Fuentes-Corona, C.G., Licea-Rodriguez, J., Younger, R., Rangel-Rojo, R., Potma, E.O., Rocha-Mendoza, I., 2019. Second harmonic generation signal from type I collagen fibers grown in vitro. Biomed. Opt. Express 10, 6449. https://doi.org/10.1364/BOE.10.006449

Fukuda, T., Ahearn, M., Roberts, A., Mattaliano, R.J., Zaal, K., Ralston, E., Plotz, P.H., Raben, N., 2006a. Autophagy and Mistargeting of Therapeutic Enzyme in Skeletal Muscle in Pompe Disease. Molecular Therapy 14, 831–839. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.08.009

Fukuda, T., Ewan, L., Bauer, M., Mattaliano, R.J., Zaal, K., Ralston, E., Plotz, P.H., Raben, N., 2006b. Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease. Annals of Neurology 59, 700–708. https://doi.org/10.1002/ana.20807

Fukushima, K., Nakamura, A., Ueda, H., Yuasa, K., Yoshida, K., Takeda, S., Ikeda, S., 2007. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). BMC Musculoskelet Disord 8, 54. https://doi.org/10.1186/1471-2474-8-54

Gallegos-Cerda, S.D., Hernández-Varela, J.D., Chanona-Pérez, J.J., Arredondo Tamayo, B., Méndez Méndez, J.V., 2023. Super-Resolution Microscopy and Their Applications in Food Materials: Beyond the Resolution Limits of Fluorescence Microscopy. Food Bioprocess Technol 16, 268–288. https://doi.org/10.1007/s11947-022-02883-4

Garbincius, J.F., Elrod, J.W., 2022. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. Physiological Reviews 102, 893–992. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2020

Gaspar, B.L., Vasishta, R.K., Radotra, B.D., 2019. Introduction to Normal Skeletal Muscle: Anatomy, Physiology, Histology, and Ultrastructure, in: Myopathology. Springer Singapore, Singapore, pp. 1–10. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1462-9_1

Gautel, M., Djinović-Carugo, K., 2016. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. Journal of Experimental Biology 219, 135–145. https://doi.org/10.1242/jeb.124941

Genthial, R., Beaurepaire, E., Schanne-Klein, M.-C., Peyrin, F., Farlay, D., Olivier, C., Bala, Y., Boivin, G., Vial, J.-C., Débarre, D., Gourrier, A., 2017. Label-free imaging of bone multiscale porosity and interfaces using third-harmonic generation microscopy. Sci Rep 7, 3419. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03548-5

Georgakoudi, I., Quinn, K.P., 2023. Label-Free Optical Metabolic Imaging in Cells and Tissues. Annu. Rev. Biomed. Eng. 25, 413–443. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044730

Giovarelli, M., Arnaboldi, F., Zecchini, S., Cornaghi, L.B., Nava, A., Sommariva, M., Clementi, E.G.I., Gagliano, N., 2022. Characterisation of Progressive Skeletal Muscle Fibrosis in the Mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy: An In Vivo and In Vitro Study. IJMS 23, 8735. https://doi.org/10.3390/ijms23158735

Glancy, B., Hartnell, L.M., Combs, C.A., Femnou, A., Sun, J., Murphy, E., Subramaniam, S., Balaban, R.S., 2017. Power Grid Protection of the Muscle Mitochondrial Reticulum. Cell Reports 19, 487–496. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.063

Glas, D., Paesen, R., Depuydt, D., Binnemans, K., Ameloot, M., De Vos, D.E., Ameloot, R., 2015. Cellulose Amorphization by Swelling in Ionic Liquid/Water Mixtures: A Combined Macroscopic and Second-Harmonic Microscopy Study. ChemSusChem 8, 82–86. https://doi.org/10.1002/cssc.201402776

Gómez, A.I., Cruz, M., López-Giménez, J.F., 2019. Evaluating the pharmacological response in fluorescence microscopy images: The Δm algorithm. PLoS ONE 14, e0211330. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211330

Gonzalez, R.C., Woods, R.E., Masters, B.R., 2009. Digital Image Processing, Third Edition. J. Biomed. Opt. 14, 029901. https://doi.org/10.1117/1.3115362

Göppert-Mayer, M., 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. Annalen der Physik 401, 273–294. https://doi.org/10.1002/andp.19314010303

Gottschalk, B., Koshenov, Z., Malli, R., Graier, W.F., 2024. Implications of mitochondrial membrane potential gradients on signaling and ATP production analyzed by correlative multi-parameter microscopy. Sci Rep 14. https://doi.org/10.1038/s41598-024-65595-z

Granger, D.N., Senchenkova, E., 2010. Inflammation and the Microcirculation.

Grounds, M.D., 2008. Complexity of Extracellular Matrix and Skeletal Muscle Regeneration, in: Skeletal Muscle Repair and Regeneration, Advances in Muscle Research. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 269–302. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6768-6_13

Gustafsson, M.G.L., 2005. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 13081–13086. https://doi.org/10.1073/pnas.0406877102

Gustafsson, M.G.L., 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy: SHORT COMMUNICATION. Journal of Microscopy 198, 82–87. https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x

Hagemann, P., Gesper, A., Happel, P., 2018. Correlative Stimulated Emission Depletion and Scanning Ion Conductance Microscopy. ACS Nano 12, 5807–5815. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01731

Haider, S.A., Cameron, A., Siva, P., Lui, D., Shafiee, M.J., Boroomand, A., Haider, N., Wong, A., 2016. Fluorescence microscopy image noise reduction using a stochastically-connected random field model. Sci Rep 6. https://doi.org/10.1038/srep20640

Hajjar, H., Boukhaddaoui, H., Rizgui, A., Sar, C., Berthelot, J., Perrin-Tricaud, C., Rigneault, H., Tricaud, N., 2018. Label-free non-linear microscopy to measure myelin outcome in a rodent model of Charcot-Marie-Tooth diseases. Journal of Biophotonics 11. https://doi.org/10.1002/jbio.201800186

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., 2011. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. Nat Neurosci 14, 1481–1488. https://doi.org/10.1038/nn.2928

Hammers, D.W., Hart, C.C., Matheny, M.K., Wright, L.A., Armellini, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., 2020. The D2.mdx mouse as a preclinical model of the skeletal muscle pathology associated with Duchenne muscular dystrophy. Sci Rep 10, 14070. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70987-y

Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A., Sauer, M., 2009. Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores. Angew Chem Int Ed 48, 6903–6908. https://doi.org/10.1002/anie.200902073

Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., Sauer, M., 2008. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. Angew Chem Int Ed 47, 6172–6176. https://doi.org/10.1002/anie.200802376

Heintzmann, R., Ficz, G., 2013. Breaking the Resolution Limit in Light Microscopy, in: Methods in Cell Biology. Elsevier, pp. 525–544. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407761-4.00022-1

Heintzmann, R., Huser, T., 2017. Super-Resolution Structured Illumination Microscopy. Chem. Rev. 117, 13890–13908. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218

Hell, S.W., Wichmann, J., 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt. Lett. 19, 780. https://doi.org/10.1364/ol.19.000780

Hepple, R.T., Mathieu-Costello, O., 2001. Estimating the size of the capillary-to-fiber interface in skeletal muscle: a comparison of methods. Journal of Applied Physiology 91, 2150–2156. https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.5.2150

Hermsen, M., De Bel, T., Den Boer, M., Steenbergen, E.J., Kers, J., Florquin, S., Roelofs, J.J.T.H., Stegall, M.D., Alexander, M.P., Smith, B.H., Smeets, B., Hilbrands, L.B., Van Der Laak, J.A.W.M., 2019. Deep Learning–Based Histopathologic Assessment of Kidney Tissue. JASN 30, 1968–1979. https://doi.org/10.1681/asn.2019020144

Herschel, J.F.W., 1845. On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 135, 143–145.

Hilzenrat, G., Gill, E.T., McArthur, S.L., 2022. Imaging approaches for monitoring THREE-DIMENSIONAL cell and tissue culture systems. Journal of Biophotonics 15, e202100380. https://doi.org/10.1002/jbio.202100380

Hoffman, E.P., Brown, R.H., Kunkel, L.M., 1987. Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus.

Hopf, F.W., Turner, P.R., P. R. Turner, Steinhardt, Richard A., Steinhardt, R.A., 2007. Calcium misregulation and the pathogenesis of muscular dystrophy. Sub-cellular biochemistry 45, 429–464. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6191-2_16

Horton, N.G., Wang, K., Kobat, D., Clark, C.G., Wise, F.W., Schaffer, C.B., Xu, C., 2013. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. Nature Photon 7, 205–209. https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.336

Huang, S., Heikal, A.A., Webb, W.W., 2002. Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein. Biophysical Journal 82, 2811–2825. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75621-X

Hudlicka, O., 2011. Microcirculation in skeletal muscle. Muscles Ligaments Tendons J 1, 3–11.

Huff, J., 2015. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution. Nat Methods 12, i–ii. https://doi.org/10.1038/nmeth.f.388

Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., Stelzer, E.H.K., 2004. Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. Science 305, 1007–1009. https://doi.org/10.1126/science.1100035

Jährling, N., Becker, K., Dodt, H.-U., 2009. 3D-reconstruction of blood vessels by ultramicroscopy. Organogenesis 5, 227–230. https://doi.org/10.4161/org.5.4.10403

James, D.S., Brereton, C.J., Davies, D.E., Jones, M.G., Campagnola, P.J., 2021. Examining lysyl oxidase-like modulation of collagen architecture in 3D spheroid models of idiopathic pulmonary fibrosis via second-harmonic generation microscopy. J. Biomed. Opt. 26. https://doi.org/10.1117/1.JBO.26.6.066501

Jing, D., Zhang, S., Luo, W., Gao, X., Men, Y., Ma, C., Liu, X., Yi, Y., Bugde, A., Zhou, B.O., Zhao, Z., Yuan, Q., Feng, J.Q., Gao, L., Ge, W.-P., Zhao, H., 2018. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. Cell Res 28, 803–818. https://doi.org/10.1038/s41422-018-0049-z

Jones, J.D., Ramser, H.E., Woessner, A.E., Quinn, K.P., 2018. In vivo multiphoton microscopy detects longitudinal metabolic changes associated with delayed skin wound healing. Commun Biol 1, 198. https://doi.org/10.1038/s42003-018-0206-4

Jonkman, J., Brown, C.M., 2015a. Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques. J Biomol Tech 26, 54–65. https://doi.org/10.7171/jbt.15-2602-003

Jonkman, J., Brown, C.M., 2015b. Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques. J Biomol Tech 26, 54–65. https://doi.org/10.7171/jbt.15-2602-003

Jungmann, R., Avendaño, M.S., Woehrstein, J.B., Dai, M., Shih, W.M., Yin, P., 2014. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. Nat Methods 11, 313–318. https://doi.org/10.1038/nmeth.2835

Kang, C., Badr, M.A., Kyrychenko, V., Eskelinen, E.-L., Shirokova, N., 2018. Deficit in PINK1/PARKIN-mediated mitochondrial autophagy at late stages of dystrophic cardiomyopathy. Cardiovascular Research 114, 90–102. https://doi.org/10.1093/cvr/cvx201

Katare, P.B., Dalmao-Fernandez, A., Mengeste, A.M., Hamarsland, H., Ellefsen, S., Bakke, H.G., Kase, E.T., Thoresen, G.H., Rustan, A.C., 2022. Energy metabolism in skeletal muscle cells from donors with different body mass index. Front. Physiol. 13, 982842. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.982842

Katz, A., 2023. The role of glycogen phosphorylase in glycogen biogenesis in skeletal muscle after exercise. Sports Medicine and Health Science 5, 29–33. https://doi.org/10.1016/j.smhs.2022.11.001

Katzir, S., Lehner, C., Renn, J. (Eds.), 2013. The Origins of Maria Göppert's Dissertation on Two-Photon Quantum Transitions at Göttingen's Institutes of Physics 1920-1933, Max Planck research library for the history and development of knowledge. Proceedings. Presented at the International Conference on the History of Quantum Physics, Edition Open Access, Berlin.

Ke, M.-T., Fujimoto, S., Imai, T., 2013. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nat Neurosci 16, 1154–1161. https://doi.org/10.1038/nn.3447

Keller, P.J., Ahrens, M.B., 2015. Visualizing Whole-Brain Activity and Development at the Single-Cell Level Using Light-Sheet Microscopy. Neuron 85, 462–483. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.039

Kirschenbaum, D., Dadgar-Kiani, E., Catto, F., Voigt, F.F., Trevisan, C., Bichsel, O., Shirani, H., Nilsson, K.P.R., Frontzek, K.J., Paganetti, P., Helmchen, F., Lee, J.H., Aguzzi, A., 2023. Whole-brain microscopy reveals distinct temporal and spatial efficacy of anti-Aβ therapies. EMBO Mol Med 15. https://doi.org/10.15252/emmm.202216789

Klietsch, R., Ervasti, J.M., Arnold, W., Campbell, K.P., Jorgensen, A.O., 1993. Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. Circulation Research 72, 349–360. https://doi.org/10.1161/01.res.72.2.349

Klotzsch, E., Smorodchenko, A., Löfler, L., Moldzio, R., Parkinson, E., Schütz, G.J., Pohl, E.E., 2015. Superresolution microscopy reveals spatial separation of UCP4 and F_0F_1-ATP synthase in neuronal mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 130–135. https://doi.org/10.1073/pnas.1415261112

Kner, P., Chhun, B.B., Griffis, E.R., Winoto, L., Gustafsson, M.G.L., 2009. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. Nat Methods 6, 339–342. https://doi.org/10.1038/nmeth.1324

Knuiman, P., Hopman, M.T.E., Mensink, M., 2015. Glycogen availability and skeletal muscle adaptations with endurance and resistance exercise. Nutr Metab (Lond) 12, 59. https://doi.org/10.1186/s12986-015-0055-9

Kobayashi, Y.M., Rader, E.P., Crawford, R.W., Iyengar, N.K., Thedens, D.R., Faulkner, J.A., Parikh, S.V., Weiss, R.M., Chamberlain, J.S., Moore, S.A., Campbell, K.P., 2008. Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. Nature 456, 511–515. https://doi.org/10.1038/nature07414

Kodippili, K., Thorne, P.K., Laughlin, M.H., Duan, D., 2021. Dystrophin deficiency impairs vascular structure and function in the canine model of Duchenne muscular dystrophy. The Journal of Pathology 254, 589–605. https://doi.org/10.1002/path.5704

Koller, A., Kaley, G., 1991. Endothelial regulation of wall shear stress and blood flow in skeletal muscle microcirculation. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 260, H862–H868. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.3.H862

Kolossov, V.L., Sivaguru, M., Huff, J., Luby, K., Kanakaraju, K., Gaskins, H.R., 2018. Airyscan super-resolution microscopy of mitochondrial morphology and dynamics in living tumor cells. Microscopy Res & Technique 81, 115–128. https://doi.org/10.1002/jemt.22968

Kong, H., Akakin, H.C., Sarma, S.E., 2013. A Generalized Laplacian of Gaussian Filter for Blob Detection and Its Applications. IEEE Trans. Cybern. 43, 1719–1733. https://doi.org/10.1109/TSMCB.2012.2228639

Kopek, B.G., Shtengel, G., Grimm, J.B., Clayton, D.A., Hess, H.F., 2013. Correlative Photoactivated Localization and Scanning Electron Microscopy. PLoS ONE 8, e77209. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077209

Krizhevsky, A., Sutskever, I., Hinton, G.E., 2017. ImageNet classification with deep convolutional neural networks. Commun. ACM 60, 84–90. https://doi.org/10.1145/3065386

Krogh, A., 1919. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. The Journal of Physiology 52, 409–415. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1919.sp001839

Kumar, A., Wu, Y., Christensen, R., Chandris, P., Gandler, W., McCreedy, E., Bokinsky, A., Colón-Ramos, D.A., Bao, Z., McAuliffe, M., Rondeau, G., Shroff, H., 2014. Dual-view plane illumination microscopy for rapid and spatially isotropic imaging. Nat Protoc 9, 2555–2573. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.172

Kumar, Akhilesh, Bhatnagar, S., Kumar, Ashok, 2010. Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat Alleviates Pathology and Improves Skeletal Muscle Function in Dystrophin-Deficient mdx Mice. The American Journal of Pathology 177, 248–260. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091176

Kusters, Y.H.A.M., Barrett, E.J., 2016. Muscle microvasculature's structural and functional specializations facilitate muscle metabolism. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 310, E379–E387. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00443.2015

Kwakwa, K., Savell, A., Davies, T., Munro, I., Parrinello, S., Purbhoo, M.A., Dunsby, C., Neil, M.A.A., French, P.M.W., 2016. easySTORM: a robust, lower-cost approach to localisation and TIRF microscopy. Journal of Biophotonics 9, 948–957. https://doi.org/10.1002/jbio.201500324

Lacin, M.E., Yildirim, M., 2024. Applications of multiphoton microscopy in imaging cerebral and retinal organoids. Front. Neurosci. 18, 1360482. https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1360482

Lagalice, L., Pichon, J., Gougeon, E., Soussi, S., Deniaud, J., Ledevin, M., Maurier, V., Leroux, I., Durand, S., Ciron, C., Franzoso, F., Dubreil, L., Larcher, T., Rouger, K., Colle, M.-A., 2018. Satellite cells fail to contribute to muscle repair but are functional in Pompe disease (glycogenosis type II). acta neuropathol commun 6, 116. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0609-y

Lagerweij, T., Dusoswa, S.A., Negrean, A., Hendrikx, E.M.L., De Vries, H.E., Kole, J., Garcia-Vallejo, J.J., Mansvelder, H.D., Vandertop, W.P., Noske, D.P., Tannous, B.A., Musters, R.J.P., Van Kooyk, Y., Wesseling, P., Zhao, X.W., Wurdinger, T., 2017. Optical clearing and fluorescence deep-tissue imaging for 3D quantitative analysis of the brain tumor microenvironment. Angiogenesis 20, 533–546. https://doi.org/10.1007/s10456-017-9565-6

Laine, R.F., Jacquemet, G., Krull, A., 2021. Imaging in focus: An introduction to denoising bioimages in the era of deep learning. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 140, 106077. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106077

Lakowicz, J.R. (Ed.), 2006a. Introduction to Fluorescence, in: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer US, Boston, MA, pp. 1–26. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_1

Lakowicz, J.R. (Ed.), 2006b. Energy Transfer, in: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer US, Boston, MA, pp. 443–475. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_13

Lakowicz, J.R. (Ed.), 2006c. Fluorophores, in: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer US, Boston, MA, pp. 63–95. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_3

Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., Toumaniantz, G., De Cian, A., Boix, C., Renaud, J.-B., Cherel, Y., Giovannangeli, C., Concordet, J.-P., Anegon, I., Huchet, C., 2014. Characterization of Dystrophin Deficient Rats: A New Model for Duchenne Muscular Dystrophy. PLoS ONE 9, e110371. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110371

Latroche, C., Matot, B., Martins-Bach, A., Briand, D., Chazaud, B., Wary, C., Carlier, P.G., Chrétien, F., Jouvion, G., 2015. Structural and Functional Alterations of Skeletal Muscle Microvasculature in Dystrophin-Deficient mdx Mice. The American Journal of Pathology 185, 2482–2494. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.05.009

Le'Clerc Arrastia, J., Heilenkötter, N., Otero Baguer, D., Hauberg-Lotte, L., Boskamp, T., Hetzer, S., Duschner, N., Schaller, J., Maass, P., 2021. Deeply Supervised UNet for Semantic Segmentation to Assist Dermatopathological Assessment of Basal Cell Carcinoma. J. Imaging 7, 71. https://doi.org/10.3390/jimaging7040071

LeCun, Y., Bengio, Y., Hinton, G., 2015. Deep learning. Nature 521, 436–444. https://doi.org/10.1038/nature14539

LeCun, Y., Boser, B.E., Denker, J.S., Henderson, D., Howard, R.E., Hubbard, W.E., Jackel, L.D., 1989. Handwritten Digit Recognition with a Back-Propagation Network.

Lecun, Y., BOTTOU, L., Bengio, Y., Haffner, P., 1998. Gradient-Based Learning Applied to Document Recognition. https://doi.org/10.1109/5.726791

Lee-Glover, L.P., Picard, M., Shutt, T.E., 2025. Mitochondria – the CEO of the cell. Journal of Cell Science 138, jcs263403. https://doi.org/10.1242/jcs.263403

Leisten, E.D., Woods, A.C., Wong, Y.C., 2023. Super-resolution microscopy: Insights into mitochondria–lysosome crosstalk in health and disease. Journal of Cell Biology 222. https://doi.org/10.1083/jcb.202305032

Lelek, M., Gyparaki, M.T., Beliu, G., Schueder, F., Griffié, J., Manley, S., Jungmann, R., Sauer, M., Lakadamyali, M., Zimmer, C., 2021. Single-molecule localization microscopy. Nat Rev Methods Primers 1, 39. https://doi.org/10.1038/s43586-021-00038-x

Lewandowska, E., Wierzba-Bobrowicz, T., Rola, R., Modzelewska, J., Stępień, T., Ługowskka, A., Pasennikk, E., Ryglewicz, D., 2008. Pathology of skeletal muscle cells in adult-onset glycogenosis type II (Pompe disease): ultrastructural study. Folia Neuropathologica.

Li, G., Li, Z., Liu, J., 2024. Amino acids regulating skeletal muscle metabolism: mechanisms of action, physical training dosage recommendations and adverse effects. Nutr Metab (Lond) 21, 41. https://doi.org/10.1186/s12986-024-00820-0

Lim, H., 2019. Harmonic Generation Microscopy 2.0: New Tricks Empowering Intravital Imaging for Neuroscience. Front. Mol. Biosci. 6, 99. https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00099

Lim, H., Sharoukhov, D., Kassim, I., Zhang, Y., Salzer, J.L., Melendez-Vasquez, C.V., 2014. Label-free imaging of Schwann cell myelination by third harmonic generation microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 18025–18030. https://doi.org/10.1073/pnas.1417820111

Lim, J.-A., Li, L., Kakhlon, O., Myerowitz, R., Raben, N., 2015. Defects in calcium homeostasis and mitochondria can be reversed in Pompe disease. Autophagy 11, 385–402. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009779

Lim, J.-A., Li, L., Raben, N., 2014. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. Front. Aging Neurosci. 6. https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00177

Litjens, G., Kooi, T., Bejnordi, B.E., Setio, A.A.A., Ciompi, F., Ghafoorian, M., Van Der Laak, J.A.W.M., Van Ginneken, B., Sánchez, C.I., 2017. A survey on deep learning in medical image analysis. Medical Image Analysis 42, 60–88. https://doi.org/10.1016/j.media.2017.07.005

Liu, G., Ruan, X., Milkie, D.E., Görlitz, F., Mueller, M., Hercule, W., Killilea, A., Betzig, E., Upadhyayula, S., 2023. Characterization, comparison, and optimization of lattice light sheets. SCIENCE ADVANCES.

Liu, T., Stephan, T., Chen, P., Keller-Findeisen, J., Chen, J., Riedel, D., Yang, Z., Jakobs, S., Chen, Z., 2022. Multi-color live-cell STED nanoscopy of mitochondria with a gentle inner membrane stain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 119. https://doi.org/10.1073/pnas.2215799119

Liu, T.-M., Chu, S.-W., Sun, C.-K., Lin, B.-L., Cheng, P.-C., Johnson, I., 2001. Multiphoton confocal microscopy using a femtosecond Cr:Forsterite laser. Scanning 23, 249–254. https://doi.org/10.1002/sca.4950230405

Liu, W., Raben, N., Ralston, E., 2013. Quantitative evaluation of skeletal muscle defects in second harmonic generation images. J. Biomed. Opt 18, 026005. https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.2.026005

Liu, Y., Wagner, S.J., Peng, T., 2022. Multi-Modality Microscopy Image Style Augmentation for Nuclei Segmentation. J. Imaging 8, 71. https://doi.org/10.3390/jimaging8030071

Lo Vercio, L.D., Green, R.M., Robertson, S., Guo, S., Dauter, A., Marchini, M., Vidal-Garcia, M., Zhao, X., Mahika, A., Marcucio, R.S., Hallgrimsson, B., Forkert, N.D., 2022. Segmentation of Tissues and Proliferating Cells in Light-Sheet Microscopy Images of Mouse Embryos Using Convolutional Neural Networks. IEEE Access 10, 105084–105100. https://doi.org/10.1109/access.2022.3210542

Loufrani, L., Dubroca, C., You, D., Li, Z., Levy, B., Paulin, D., Henrion, D., 2004. Absence of Dystrophin in Mice Reduces NO-Dependent Vascular Function and Vascular Density: Total Recovery After a Treatment with the Aminoglycoside Gentamicin. ATVB 24, 671–676. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000118683.99628.42

Lugo-Hernandez, E., Squire, A., Hagemann, N., Brenzel, A., Sardari, M., Schlechter, J., Sanchez-Mendoza, E.H., Gunzer, M., Faissner, A., Hermann, D.M., 2017. 3D visualization and quantification of microvessels in the whole ischemic mouse brain using solvent-based clearing and light sheet microscopy. J Cereb Blood Flow Metab 37, 3355–3367. https://doi.org/10.1177/0271678X17698970

Mancini, A.E., Rizzo, M.A., 2024. A Novel Single-Color FRET Sensor for Rho-Kinase Reveals Calcium-Dependent Activation of RhoA and ROCK. Sensors 24, 6869. https://doi.org/10.3390/s24216869

Mann, C.J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A.L., Muñoz-Cánoves, P., 2011. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. Skeletal Muscle 1, 21. https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-21

Mannam, V., Zhang, Y., Zhu, Y., Nichols, E., Wang, Q., Sundaresan, V., Zhang, S., Smith, C., Bohn, P.W., Howard, S.S., 2022. Real-time image denoising of mixed Poisson–Gaussian noise in fluorescence microscopy images using ImageJ. Optica 9, 335. https://doi.org/10.1364/optica.448287

Manno, C., Tammineni, E., Figueroa, L., Oropeza-Almazán, Y., Rios, E., 2022. A novel method for determining murine skeletal muscle fiber type using autofluorescence lifetimes. Journal of General Physiology 154, e202213143. https://doi.org/10.1085/jgp.202213143

Masters, B.R., So, P.T.C., 2004. Antecedents of two-photon excitation laser scanning microscopy. Microscopy Res & Technique 63, 3–11. https://doi.org/10.1002/jemt.10418

McAllister, R., Amann, J., Laughlin, M., 1993. Skeletal Muscle Fiber Types and Their Vascular Support. J reconstr Microsurg 9, 313–317. https://doi.org/10.1055/s-2007-1006673

McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., Duan, D., 2015. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. Disease Models & Mechanisms 8, 195–213. https://doi.org/10.1242/dmm.018424

McKey, J., Cameron, L.A., Lewis, D., Batchvarov, I.S., Capel, B., 2020. Combined iDISCO and CUBIC tissue clearing and lightsheet microscopy for in toto analysis of the adult mouse ovary†. Biology of Reproduction 102, 1080–1089. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa012

Meher, B., Panda, C.S., 2020. An Image Segmentation Approach Using Watershed Technique.

Memeo, R., Paiè, P., Sala, F., Castriotta, M., Guercio, C., Vaccari, T., Osellame, R., Bassi, A., Bragheri, F., 2021. Automatic imaging of *Drosophila* embryos with light sheet fluorescence microscopy on chip. Journal of Biophotonics 14, e202000396. https://doi.org/10.1002/jbio.202000396

Mendell, J.R., Engel, W.K., Derrer, E.C., 1971. Duchenne Muscular Dystrophy: Functional Ischemia Reproduces Its Characteristic Lesions. Science 172, 1143–1145. https://doi.org/10.1126/science.172.3988.1143

Milacic, M., Beavers, D., Conley, P., Gong, C., Gillespie, M., Griss, J., Haw, R., Jassal, B., Matthews, L., May, B., Petryszak, R., Ragueneau, E., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Stephan, R., Tiwari, K., Varusai, T., Weiser, J., Wright, A., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P., 2024. The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. Nucleic Acids Research 52, D672–D678. https://doi.org/10.1093/nar/gkad1025

Miller, D.R., Jarrett, J.W., Hassan, A.M., Dunn, A.K., 2017. Deep tissue imaging with multiphoton fluorescence microscopy. Current Opinion in Biomedical Engineering 4, 32–39. https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.09.004

Minsky, M., Papert, S., 1969. Perceptrons: an introduction to computational geometry, Expanded ed. ed. MIT Press, Cambridge, Mass.

Mishra, P., Varuzhanyan, G., Pham, A.H., Chan, D.C., 2015. Mitochondrial Dynamics Is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization. Cell Metabolism 22, 1033–1044. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.027

Mito, T., Vincent, A.E., Faitg, J., Taylor, R.W., Khan, N.A., McWilliams, T.G., Suomalainen, A., 2022. Mosaic dysfunction of mitophagy in mitochondrial muscle disease. Cell Metabolism 34, 197-208.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.017

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., Tsien, R.Y., 1997. Fluorescent indicators for Ca2+based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature 388, 882–887. https://doi.org/10.1038/42264

Miyazaki, D., Nakamura, A., Fukushima, K., Yoshida, K., Takeda, S., Ikeda, S., 2011. Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. Human Molecular Genetics 20, 1787–1799. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr062

Mohammadian, S., Fokkema, J., Agronskaia, A.V., Liv, N., De Heus, C., Van Donselaar, E., Blab, G.A., Klumperman, J., Gerritsen, H.C., 2019. High accuracy, fiducial marker-based image registration of correlative microscopy images. Sci Rep 9, 3211. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40098-4

Monici, M., 2005. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications, in: Biotechnology Annual Review. Elsevier, pp. 227–256. https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2

Moore, T.M., Lin, A.J., Strumwasser, A.R., Cory, K., Whitney, K., Ho, Theodore, Ho, Timothy, Lee, J.L., Rucker, D.H., Nguyen, C.Q., Yackly, A., Mahata, S.K., Wanagat, J., Stiles, L., Turcotte, L.P., Crosbie, R.H., Zhou, Z., 2020. Mitochondrial Dysfunction Is an Early Consequence of Partial or Complete Dystrophin Loss in mdx Mice. Front. Physiol. 11, 690. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00690

Moradi, N., Sanfrancesco, V.C., Champsi, S., Hood, D.A., 2024. Regulation of lysosomes in skeletal muscle during exercise, disuse and aging. Free Radical Biology and Medicine 225, 323–332. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.09.028

Morizet, J., Olivier, N., Aigrot, M.-S., Mahou, P., Martin, E., Desmazieres, A., Stankoff, B., Stringari, C., Beaurepaire, E., 2025. Multiscale characterization of myelin distribution with polarized THG microscopy. Optica 12, 1122. https://doi.org/10.1364/OPTICA.562091

Müller, C.B., Enderlein, J., 2010. Image Scanning Microscopy. Phys. Rev. Lett. 104. https://doi.org/10.1103/physrevlett.104.198101

Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K., 2001. A high signal-to-noise Ca2+ probe composed of a single green fluorescent protein. Nature Biotechnology 19, 137–141. https://doi.org/10.1038/84397

Narayanasamy, K.K., Stojic, A., Li, Y., Sass, S., Hesse, M.R., Deussner-Helfmann, N.S., Dietz, M.S., Kuner, T., Klevanski, M., Heilemann, M., 2021. Visualizing Synaptic Multi-Protein Patterns of Neuronal Tissue With DNA-Assisted Single-Molecule Localization Microscopy. Front. Synaptic Neurosci. 13, 671288. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.671288

Naumova, N., Šachl, R., 2020. Regulation of Cell Death by Mitochondrial Transport Systems of Calcium and Bcl-2 Proteins. Membranes 10, 299. https://doi.org/10.3390/membranes10100299

Nederveen, J.P., Betz, M.W., Snijders, T., Parise, G., 2021. The Importance of Muscle Capillarization for Optimizing Satellite Cell Plasticity. Exercise and Sport Sciences Reviews 49, 284–290. https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000270

Nguyen, F., Guigand, L., Goubault-Leroux, I., Wyers, M., Cherel, Y., 2005. Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrophy. Neuromuscular Disorders 15, 154–163. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.11.002

Nielsen, J., Gejl, K.D., Hey-Mogensen, M., Holmberg, H., Suetta, C., Krustrup, P., Elemans, C.P.H., Ørtenblad, N., 2017. Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. The Journal of Physiology 595, 2839–2847. https://doi.org/10.1113/JP273040

Nielsen, J., Ørtenblad, N., 2013. Physiological aspects of the subcellular localization of glycogen in skeletal muscle. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 38, 91–99. https://doi.org/10.1139/apnm-2012-0184

Nilsson, M.I., MacNeil, L.G., Kitaoka, Y., Suri, R., Young, S.P., Kaczor, J.J., Nates, N.J., Ansari, M.U., Wong, T., Ahktar, M., Brandt, L., Hettinga, B.P., Tarnopolsky, M.A., 2015. Combined aerobic exercise and enzyme replacement therapy rejuvenates the mitochondrial–lysosomal axis and alleviates autophagic blockage in Pompe disease. Free Radical Biology and Medicine 87, 98–112. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.019

Odin, C., Guilbert, T., Alkilani, A., Boryskina, O.P., Fleury, V., Le Grand, Y., 2008. Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy. Opt. Express 16, 16151. https://doi.org/10.1364/OE.16.016151

Ogura, Y., Tajrishi, M.M., Sato, S., Hindi, S.M., Kumar, A., 2014. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. Front. Cell Dev. Bio. 2. https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00011

Oktay, O., Schlemper, J., Folgoc, L.L., Lee, M., Heinrich, M., Misawa, K., Mori, K., McDonagh, S., Hammerla, N.Y., Kainz, B., Glocker, B., Rueckert, D., 2018. Attention U-Net: Learning Where to Look for the Pancreas. https://doi.org/10.48550/arXiv.1804.03999

Olivier, N., Aptel, F., Plamann, K., Schanne-Klein, M.-C., Beaurepaire, E., 2010. Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea. Opt. Express 18, 5028. https://doi.org/10.1364/OE.18.005028

Otsu, N., 1979. A TIreshold Selection Method from Gray-Level Histograms.

Ouzounov, D.G., Wang, T., Wang, M., Feng, D.D., Horton, N.G., Cruz-Hernández, J.C., Cheng, Y.-T., Reimer, J., Tolias, A.S., Nishimura, N., Xu, C., 2017. In vivo three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain. Nature Methods 14, 388–390. https://doi.org/10.1038/nmeth.4183

Paddock, S.W., 2000. Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. MB 16, 127–150. https://doi.org/10.1385/MB:16:2:127

Padmakant Dhage, Dr. S. K. Shah, S.K.N. College of Engg. Vadgaon Bk Pune 43, 2015. Watershed and Region Growing Segmentation Tumor Detection. IJERT V4, IJERTV4IS031088. https://doi.org/10.17577/IJERTV4IS031088

Pajić, T., Todorović, N.V., Živić, M., Nikolić, S.N., Rabasović, M.D., Clayton, A.H.A., Krmpot, A.J., 2022. Label-free third harmonic generation imaging and quantification of lipid droplets in live filamentous fungi. Sci Rep 12, 18760. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23502-4

Palmer, C.S., Lou, J., Kouskousis, B., Pandzic, E., Anderson, A.J., Kang, Y., Hinde, E., Stojanovski, D., 2021. Super-resolution microscopy reveals the arrangement of inner membrane protein complexes in mammalian mitochondria. Journal of Cell Science 134, jcs252197. https://doi.org/10.1242/jcs.252197

Pantazis, P., Maloney, J., Wu, D., Fraser, S.E., 2010. Second harmonic generating (SHG) nanoprobes for in vivo imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 14535–14540. https://doi.org/10.1073/pnas.1004748107

Parhamifar, L., Wu, L., Andersen, H., Moghimi, S.M., 2014. Live-cell fluorescent microscopy platforms for real-time monitoring of polyplex–cell interaction: Basic guidelines. Methods 68, 300–307. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.004

Parry, H.A., Willingham, T.B., Giordano, K.A., Kim, Y., Qazi, S., Knutson, J.R., Combs, C.A., Glancy, B., 2024. Impact of capillary and sarcolemmal proximity on mitochondrial structure and energetic function in skeletal muscle. The Journal of Physiology JP286246. https://doi.org/10.1113/JP286246

Paul-Gilloteaux, P., Heiligenstein, X., Belle, M., Domart, M.-C., Larijani, B., Collinson, L., Raposo, G., Salamero, J., 2017. eC-CLEM: flexible multidimensional registration software for correlative microscopies. Nat Methods 14, 102–103. https://doi.org/10.1038/nmeth.4170

Pavone, F.S., Campagnola, P.J., 2014. Second harmonic generation imaging. CRC Press Boca Raton, FL, USA:

Pawley, James B, 2006. Fundamental Limits in Confocal Microscopy.

Pawley, James B., 2006. Points, Pixels, and Gray Levels: Digitizing Image Data, in: Pawley, J.B. (Ed.), Handbook Of Biological Confocal Microscopy. Springer US, Boston, MA, pp. 59–79. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_4

Pelicci, S., Furia, L., Pelicci, P.G., Faretta, M., 2023. Correlative Multi-Modal Microscopy: A Novel Pipeline for Optimizing Fluorescence Microscopy Resolutions in Biological Applications. Cells 12, 354. https://doi.org/10.3390/cells12030354

Pelosi, A.G., Silveira-Alves, E., Cocca, L.H.Z., Valverde, J.V., Oliveira, G.R., Da Silva, D.L., De Boni, L., Gonçalves, P.J., Mendonca, C.R., 2023. Two-Photon Absorption and Multiphoton Excited Fluorescence of Acetamide-Chalcone Derivatives: The Role of Dimethylamine Group on the Nonlinear Optical and Photophysical Properties. Molecules 28, 1572. https://doi.org/10.3390/molecules28041572

Pena, A.-M., Boulesteix, T., Dartigalongue, T., Schanne-Klein, M.-C., 2005. Chiroptical Effects in the Second Harmonic Signal of Collagens I and IV. J. Am. Chem. Soc. 127, 10314–10322. https://doi.org/10.1021/ja0520969

Percival, J.M., Anderson, K.N.E., Gregorevic, P., Chamberlain, J.S., Froehner, S.C., 2008. Functional Deficits in nNOSμ-Deficient Skeletal Muscle: Myopathy in nNOS Knockout Mice. PLoS ONE 3, e3387. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003387

Percival, J.M., Siegel, M.P., Knowels, G., Marcinek, D.J., 2013. Defects in mitochondrial localization and ATP synthesis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy are not alleviated by PDE5 inhibition. Human Molecular Genetics 22, 153–167. https://doi.org/10.1093/hmg/dds415

Periasamy, A., Skoglund, P., Noakes, C., Keller, R., 1999. An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in xenopus morphogenesis. Microsc. Res. Tech. 47, 172–181. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19991101)47:3<172::AID-JEMT3>3.0.CO;2-A

Periasamy, M., Herrera, J.L., Reis, F.C.G., 2017. Skeletal Muscle Thermogenesis and Its Role in Whole Body Energy Metabolism. Diabetes Metab J 41, 327. https://doi.org/10.4093/dmj.2017.41.5.327

Perona, P., Malik, J., 1990. Scale-space and edge detection using anisotropic diffusion. IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell. 12, 629–639. https://doi.org/10.1109/34.56205

Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., Sweeney, H.L., 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 3710–3714. https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3710

Pham, A.H., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2012. Mouse lines with photo-activatable mitochondria to study mitochondrial dynamics. Genesis 50, 833–843. https://doi.org/10.1002/dvg.22050

Picard, M., White, K., Turnbull, D.M., 2013. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. Journal of Applied Physiology 114, 161–171. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01096.2012

Pichon, J., Ledevin, M., Larcher, T., Jamme, F., Rouger, K., Dubreil, L., 2022. Label-free 3D characterization of cardiac fibrosis in muscular dystrophy using SHG imaging of cleared tissue. Biology of the Cell 114, 91–103. https://doi.org/10.1111/boc.202100056

Platt, F.M., d'Azzo, A., Davidson, B.L., Neufeld, E.F., Tifft, C.J., 2018. Lysosomal storage diseases. Nat Rev Dis Primers 4, 27. https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4

Podkalicka, P., Mucha, O., Kaziród, K., Bronisz-Budzyńska, I., Ostrowska-Paton, S., Tomczyk, M., Andrysiak, K., Stępniewski, J., Dulak, J., Łoboda, A., 2021. Age-Dependent Dysregulation of Muscle Vasculature and Blood Flow Recovery after Hindlimb Ischemia in the mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Biomedicines 9, 481. https://doi.org/10.3390/biomedicines9050481

Prasad, V., Millay, D.P., 2021. Skeletal muscle fibers count on nuclear numbers for growth. Seminars in Cell & Developmental Biology 119, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.04.015

Qi, Y., Yu, T., Xu, J., Wan, P., Ma, Y., Zhu, J., Li, Y., Gong, H., Luo, Q., Zhu, D., 2019. FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. Sci. Adv. 5, eaau8355. https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8355

Qiao, C., Li, Z., Wang, Z., Lin, Y., Liu, C., Zhang, S., Liu, Y., Feng, Y., Yang, X., Fu, W., Dong, X., Guo, J., Xu, W., Wang, X., Jiang, T., Meng, Q., Wang, Q., Dai, Q., Li, D., 2025. Fast-adaptive super-resolution lattice light-sheet microscopy for rapid, long-term, near-isotropic subcellular imaging. Nat Methods 22, 1059–1069. https://doi.org/10.1038/s41592-025-02678-3

Raben, N., Hill, V., Shea, L., Takikita, S., Baum, R., Mizushima, N., Ralston, E., Plotz, P., 2008. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. Human Molecular Genetics 17, 3897–3908. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn292

Raben, N., Nagaraju, K., Lee, E., Plotz, P., 2000. Modulation of disease severity in mice with targeted disruption of the acid a -glucosidase gene. Neuromuscular Disorders.

Raben, N., Plotz, P., Byrne, B.J., 2002. Acid α-Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease).

Raben, N., Ralston, E., Chien, Y.-H., Baum, R., Schreiner, C., Hwu, W.-L., Zaal, K.J.M., Plotz, P.H., 2010. Differences in the predominance of lysosomal and autophagic pathologies between infants and adults with Pompe disease: implications for therapy. Molecular Genetics and Metabolism 101, 324–331. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.08.001

Raben, N., Roberts, A., Plotz, P.H., 2006. Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease.

Raben, N., Wong, A., Ralston, E., Myerowitz, R., 2012. Autophagy and mitochondria in Pompe disease: Nothing is so new as what has long been forgotten. Am. J. Med. Genet. 160C, 13–21. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31317

Rajinikanth, V., Kadry, S., Mohan, R., Rama, A., Khan, M.A., Kim, J., 2023. Colon histology slide classification with deep-learning framework using individual and fused features. MBE 20, 19454–19467. https://doi.org/10.3934/mbe.2023861

Rames, M.J., Kenison, J.P., Heineck, D., Civitci, F., Szczepaniak, M., Zheng, T., Shangguan, J., Zhang, Y., Tao, K., Esener, S., Nan, X., 2023. Multiplexed and Millimeter-Scale Fluorescence Nanoscopy of Cells and Tissue Sections via Prism-Illumination and Microfluidics-Enhanced DNA-PAINT. Chemical & Biomedical Imaging 1, 817–830. https://doi.org/10.1021/cbmi.3c00060

Ramos-Gomes, F., Möbius, W., Bonacina, L., Alves, F., Markus, M.A., 2019. Bismuth Ferrite Second Harmonic Nanoparticles for Pulmonary Macrophage Tracking. Small 15, 1803776. https://doi.org/10.1002/smll.201803776

Rehberg, M., Krombach, F., Pohl, U., Dietzel, S., 2011. Label-Free 3D Visualization of Cellular and Tissue Structures in Intact Muscle with Second and Third Harmonic Generation Microscopy. PLoS ONE 6, e28237. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028237

Ren, W., Ge, X., Li, M., Sun, J., Li, S., Gao, S., Shan, C., Gao, B., Xi, P., 2024. Visualization of cristae and mtDNA interactions via STED nanoscopy using a low saturation power probe. Light Sci Appl 13, 116. https://doi.org/10.1038/s41377-024-01463-9

Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., Wang, V.X., Tang, C.Y., Olsen, O., Dulac, C., Osten, P., Tessier-Lavigne, M., 2016. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell 165, 1789–1802. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.007

Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., Tessier-Lavigne, M., 2014. iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. Cell 159, 896–910. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010

Reuser, A., Hirschhorn, R., Kroos, M., 2018. Pompe disease: glycogen storage disease type II, acid α-glucosidase (acid maltase) deficiency. The online metabolic and molecular bases of inherited disease.

Richardson, D.S., Lichtman, J.W., 2015. Clarifying Tissue Clearing. Cell 162, 246–257. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067

Robert Hooke's Micrographia of 1665 and 1667, 2010. . Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh 40, 374–376. https://doi.org/10.4997/JRCPE.2010.420

Robertson, R.T., Levine, S.T., Haynes, S.M., Gutierrez, P., Baratta, J.L., Tan, Z., Longmuir, K.J., 2015. Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. Histochem Cell Biol 143, 225–234. https://doi.org/10.1007/s00418-014-1301-3

Robinson, B.K., Cortes, E., Rice, A.J., Sarper, M., Del Río Hernández, A., 2016. Quantitative analysis of 3D extracellular matrix remodelling by pancreatic stellate cells. Biology Open 5, 875–882. https://doi.org/10.1242/bio.017632

Romanul, F.C.A., 1964. Distribution of Capillaries in Relation to Oxidative Metabolism of Skeletal Muscle Fibres. Nature 201, 307–308. https://doi.org/10.1038/201307a0

Romero-Garcia, S., Prado-Garcia, H., 2019. Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). Int J Oncol. https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4696

Ronneberger, O., Fischer, P., Brox, T., 2015. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation, in: Navab, N., Hornegger, J., Wells, W.M., Frangi, A.F. (Eds.), Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015. Springer International Publishing, Cham, pp. 234–241.

Rosenblatt, F., 1958. The perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain. Psychological Review 65, 386–408. https://doi.org/10.1037/h0042519

Rothstein, E.C., Carroll, S., Combs, C.A., Jobsis, P.D., Balaban, R.S., 2005. Skeletal Muscle NAD(P)H Two-Photon Fluorescence Microscopy In Vivo: Topology and Optical Inner Filters. Biophysical Journal 88, 2165–2176. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.053165

Rouède, D., Bellanger, J.-J., Schaub, E., Recher, G., Tiaho, F., 2013. Theoretical and Experimental SHG Angular Intensity Patterns from Healthy and Proteolysed Muscles. Biophysical Journal 104, 1959–1968. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.047

Rouède, D., Recher, G., Bellanger, J.-J., Lavault, M.-T., Schaub, E., Tiaho, F., 2011. Modeling of Supramolecular Centrosymmetry Effect on Sarcomeric SHG Intensity Pattern of Skeletal Muscles. Biophysical Journal 101, 494–503. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.065

Rouède, D., Schaub, E., Bellanger, J.-J., Ezan, F., Scimeca, J.-C., Baffet, G., Tiaho, F., 2017. Determination of extracellular matrix collagen fibril architectures and pathological remodeling by polarization dependent second harmonic microscopy. Sci Rep 7, 12197. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12398-0

Rowland, L.A., Bal, N.C., Periasamy, M., 2015. The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. Biological Reviews 90, 1279–1297. https://doi.org/10.1111/brv.12157

Rubart, M., 2004. Two-Photon Microscopy of Cells and Tissue. Circulation Research 95, 1154–1166. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000150593.30324.42

Rumelhart, D.E., Hintont, G.E., Williams, R.J., 1986. Learning representations by back-propagating errors.

Rust, M.J., Bates, M., Zhuang, X., 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat Methods 3, 793–796. https://doi.org/10.1038/nmeth929

Saletnik, Ł., Szczęsny, W., Szmytkowski, J., Fisz, J.J., 2023. On the Nature of Stationary and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Collagen Powder from Bovine Achilles Tendon. IJMS 24, 7631. https://doi.org/10.3390/ijms24087631

Sandri, M., 2010. Autophagy in skeletal muscle. FEBS Letters 584, 1411–1416. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.056

Scheffler, I.E., 2007. Structure and Morphology. Integration into the Cell, in: Mitochondria. pp. 18–59. https://doi.org/10.1002/9780470191774.ch3

Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., Eggeling, C., Sauer, M., Biehlmaier, O., Drummen, G.P.C., 2019. Super-resolution microscopy demystified. Nat Cell Biol 21, 72–84. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8

Schermelleh, L., Heintzmann, R., Leonhardt, H., 2010. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. Journal of Cell Biology 190, 165–175. https://doi.org/10.1083/jcb.201002018

Schiaffino, S., Reggiani, C., 2011. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. Physiological Reviews 91, 1447–1531. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010

Schmidt, T., Pasternak, T., Liu, K., Blein, T., Aubry-Hivet, D., Dovzhenko, A., Duerr, J., Teale, W., Ditengou, F.A., Burkhardt, H., Ronneberger, O., Palme, K., 2014. The iRoCS Toolbox – 3D analysis of the plant root apical meristem at cellular resolution. The Plant Journal 77, 806–814. https://doi.org/10.1111/tpj.12429

Schneidereit, D., Bröllochs, A., Ritter, P., Kreiß, L., Mokhtari, Z., Beilhack, A., Krönke, G., Ackermann, J.A., Faas, M., Grüneboom, A., Schürmann, S., Friedrich, O., 2021. An advanced optical clearing protocol allows label-free detection of tissue necrosis *via* multiphoton microscopy in injured whole muscle. Theranostics 11, 2876–2891. https://doi.org/10.7150/thno.51558

Schnitzbauer, J., Strauss, M.T., Schlichthaerle, T., Schueder, F., Jungmann, R., 2017. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. Nat Protoc 12, 1198–1228. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.024

Schulz, O., Pieper, C., Clever, M., Pfaff, J., Ruhlandt, A., Kehlenbach, R.H., Wouters, F.S., Großhans, J., Bunt, G., Enderlein, J., 2013. Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 21000–21005. https://doi.org/10.1073/pnas.1315858110

Schürmann, S., Von Wegner, F., Fink, R.H.A., Friedrich, O., Vogel, M., 2010. Second Harmonic Generation Microscopy Probes Different States of Motor Protein Interaction in Myofibrils. Biophysical Journal 99, 1842–1851. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.005

Sebori, R., Kuno, A., Hosoda, R., Hayashi, T., Horio, Y., 2018. Resveratrol Decreases Oxidative Stress by Restoring Mitophagy and Improves the Pathophysiology of Dystrophin-Deficient *mdx* Mice. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018, 1–13. https://doi.org/10.1155/2018/9179270

Segal, S.S., 2005. Regulation of Blood Flow in the Microcirculation. Microcirculation 12, 33–45. https://doi.org/10.1080/10739680590895028

Segal, S.S., Damon, D.N., Duling, B.R., 1989. Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 256, H832–H837. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.256.3.H832

Sekine, S., Youle, R.J., 2018. PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. BMC Biol 16, 2. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0470-7

Seo, J., Choe, M., Kim, S.-Y., 2016. Clearing and Labeling Techniques for Large-Scale Biological Tissues. Molecules and Cells 39, 439–446. https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0088

Sepúlveda-Ramírez, S.P., Toledo-Jacobo, L., Garno, C., Pal, D., Ross, C., Ellis, A., Shuster, C.B., 2019. Live-cell fluorescence imaging of echinoderm embryos, in: Methods in Cell Biology. Elsevier, pp. 379–397. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.10.006

Setu, M.A.K., Schmidt, S., Musial, G., Stern, M.E., Steven, P., 2022. Segmentation and Evaluation of Corneal Nerves and Dendritic Cells From In Vivo Confocal Microscopy Images Using Deep Learning. Trans. Vis. Sci. Tech. 11, 24. https://doi.org/10.1167/tvst.11.6.24

Shea, L., Raben, N., 2009. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. CP. https://doi.org/10.5414/CPP47042

Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. Journal of Cellular and Comparative Physiology 59, 223–239. https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302

Shishmarev, D., 2020. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: recent progress and unanswered questions. Biophys Rev 12, 143–153. https://doi.org/10.1007/s12551-020-00610-x

Silvestri, L., Costantini, I., Sacconi, L., Pavone, F.S., 2016. Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. J. Biomed. Opt 21, 081205. https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.8.081205

Smith, L.R., Hammers, D.W., Sweeney, H.L., Barton, E.R., 2016. Increased collagen cross-linking is a signature of dystrophin-deficient muscle. Muscle and Nerve 54, 71–78. https://doi.org/10.1002/mus.24998

Smolen, J.A., Wooley, K.L., 2022. Fluorescence lifetime image microscopy prediction with convolutional neural networks for cell detection and classification in tissues. PNAS Nexus 1. https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac235

Smołka, J., 2005. Watershed based region growing algorithm.

Spencer, M.J., Croall, D.E., Tidball, J.G., 1995. Calpains Are Activated in Necrotic Fibers from mdx Dystrophic Mice. Journal of Biological Chemistry 270, 10909–10914. https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10909

Stockes, G., Gabriel, 1852. On the change of refrangibility of light. https://doi.org/10.1098/rstl.1852.0022

Stringari, C., Abdeladim, L., Malkinson, G., Mahou, P., Solinas, X., Lamarre, I., Brizion, S., Galey, J.-B., Supatto, W., Legouis, R., Pena, A.-M., Beaurepaire, E., 2017. Multicolor two-photon imaging of endogenous fluorophores in living tissues by wavelength mixing. Sci Rep 7, 3792. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03359-8

Strupler, M., Pena, A.-M., Hernest, M., Tharaux, P.-L., Martin, J.-L., Beaurepaire, E., Schanne-Klein, M.-C., 2007. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. Opt. Express 15, 4054. https://doi.org/10.1364/OE.15.004054

Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Yukinaga, H., Kuno, A., Ueda, H.R., 2015. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. Nat Protoc 10, 1709–1727. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.085

Taghanaki, S.A., Zheng, Y., Kevin Zhou, S., Georgescu, B., Sharma, P., Xu, D., Comaniciu, D., Hamarneh, G., 2019. Combo loss: Handling input and output imbalance in multi-organ segmentation. Computerized Medical Imaging and Graphics 75, 24–33. https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2019.04.005

Tainaka, K., Kuno, A., Kubota, S.I., Murakami, T., Ueda, H.R., 2016. Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 32, 713–741. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125001

Tainaka, K., Murakami, T.C., Susaki, E.A., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K., Hayashi-Takagi, A., Sekiya, H., Arima, Y., Nojima, S., Ikemura, M., Ushiku, T., Shimizu, Y., Murakami, M., Tanaka, K.F., Iino, M., Kasai, H., Sasaoka, T., Kobayashi, K., Miyazono, K., Morii, E., Isa, T., Fukayama,

M., Kakita, A., Ueda, H.R., 2018. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. Cell Reports 24, 2196-2210.e9. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.056

Tait, S.W.G., Green, D.R., 2012. Mitochondria and cell signalling. Journal of Cell Science 125, 807–815. https://doi.org/10.1242/jcs.099234

Tanabe, A., Hibi, T., Ipponjima, S., Matsumoto, K., Yokoyama, M., Kurihara, M., Hashimoto, N., Nemoto, T., 2015. Correcting spherical aberrations in a biospecimen using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy. J. Biomed. Opt 20, 101204. https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.10.101204

Tandon, A., Villa, C.R., Hor, K.N., Jefferies, J.L., Gao, Z., Towbin, J.A., Wong, B.L., Mazur, W., Fleck, R.J., Sticka, J.J., Benson, D.W., Taylor, M.D., 2015. Myocardial Fibrosis Burden Predicts Left Ventricular Ejection Fraction and Is Associated With Age and Steroid Treatment Duration in Duchenne Muscular Dystrophy. JAHA 4, e001338. https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001338

Tandon, I., Quinn, K.P., Balachandran, K., 2021. Label-Free Multiphoton Microscopy for the Detection and Monitoring of Calcific Aortic Valve Disease. Front. Cardiovasc. Med. 8, 688513. https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.688513

Thurberg, B.L., Lynch Maloney, C., Vaccaro, C., Afonso, K., Tsai, A.C.-H., Bossen, E., Kishnani, P.S., O'Callaghan, M., 2006. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease. Laboratory Investigation 86, 1208–1220. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700484

Tidball, J.G., Wehling-Henricks, M., 2007. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. Journal of Applied Physiology 102, 1677–1686. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01145.2006

Tokunaga, M., Imamoto, N., Sakata-Sogawa, K., 2008. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. Nat Methods 5, 159–161. https://doi.org/10.1038/nmeth1171

Tomasi, C., Manduchi, R., 1998. Bilateral filtering for gray and color images, in: Sixth International Conference on Computer Vision (IEEE Cat. No.98CH36271). Presented at the IEEE 6th International Conference on Computer Vision, Narosa Publishing House, Bombay, India, pp. 839–846. https://doi.org/10.1109/ICCV.1998.710815

Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., Deisseroth, K., 2014. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. Nat Protoc 9, 1682–1697. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.123

Toscano, A., Rodolico, C., Musumeci, O., 2019. Multisystem late onset Pompe disease (LOPD): an update on clinical aspects. Ann. Transl. Med 7, 284–284. https://doi.org/10.21037/atm.2019.07.24

Tserevelakis, G.J., Megalou, E.V., Filippidis, G., Petanidou, B., Fotakis, C., Tavernarakis, N., 2014. Label-Free Imaging of Lipid Depositions in C. elegans Using Third-Harmonic Generation Microscopy. PLoS ONE 9, e84431. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084431

Tsuda, T., 2018. Clinical Manifestations and Overall Management Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy, in: Bernardini, C. (Ed.), Duchenne Muscular Dystrophy, Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY, pp. 19–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7374-3_2

Turner, P.R., Westwood, T., Regen, C.M., Steinhardt, R.A., 1988. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. Nature 335, 735–738. https://doi.org/10.1038/335735a0

Van Den Hout, H.M.P., Hop, W., Van Diggelen, O.P., Smeitink, J.A.M., Smit, G.P.A., Poll-The, B.-T.T., Bakker, H.D., Loonen, M.C.B., De Klerk, J.B.C., Reuser, A.J.J., Van Der Ploeg, A.T., 2003. The Natural Course of Infantile Pompe's Disease: 20 Original Cases Compared With 133 Cases From the Literature. Pediatrics 112, 332–340. https://doi.org/10.1542/peds.112.2.332

van der Ploeg, A.T., Reuser, A.J., 2008. Pompe's disease. The Lancet 372, 1342–1353. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X

van Leeuwenhoek, A., 1932. Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals": being some Account of the Father of Protozoology and Bacteriology and his Multifarious Discoveries in these Disciplines. Nature 130, 679–680. https://doi.org/10.1038/130679a0

Varone, A., Xylas, J., Quinn, K.P., Pouli, D., Sridharan, G., McLaughlin-Drubin, M.E., Alonzo, C., Lee, K., Münger, K., Georgakoudi, I., 2014. Endogenous Two-Photon Fluorescence Imaging Elucidates Metabolic Changes Related to Enhanced Glycolysis and Glutamine Consumption in Precancerous Epithelial Tissues. Cancer Research 74, 3067–3075. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2713

Venugopal, V., Pavlakis, S., 2023. Duchenne Muscular Dystrophy.

Verma, M., Asakura, Y., Hirai, H., Watanabe, S., Tastad, C., Fong, G.-H., Ema, M., Call, J.A., Lowe, D.A., Asakura, A., 2010. Flt-1 haploinsufficiency ameliorates muscular dystrophy phenotype by developmentally increased vasculature in mdx mice. Human Molecular Genetics 19, 4145–4159. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq334

Verma, M., Shimizu-Motohashi, Y., Asakura, Y., Ennen, J.P., Bosco, J., Zhou, Z., Fong, G.-H., Josiah, S., Keefe, D., Asakura, A., 2019. Inhibition of FLT1 ameliorates muscular dystrophy phenotype by increased vasculature in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. PLoS Genet 15, e1008468. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008468

Villalta, S.A., Nguyen, H.X., Deng, B., Gotoh, T., Tidball, J.G., 2008. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. Human Molecular Genetics 18, 482–496. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn376

Visser, A.J.W.G., Hoek, A.V., 1981. THE FLUORESCENCE DECAY OF REDUCED NICOTINAMIDES IN AQUEOUS SOLUTION AFTER EXCITATION WITH A UV-MODE LOCKED Ar ION LASER. Photochem & Photobiology 33, 35–40. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1981.tb04293.x

Voie, A.H., Spelman, F.A., 1995. Three-dimensional reconstruction of the cochlea from two-dimensional images of optical sections. Computerized Medical Imaging and Graphics 19, 377–384. https://doi.org/10.1016/0895-6111(95)00034-8

Voigt, F.F., Kirschenbaum, D., Platonova, E., Pagès, S., Campbell, R.A.A., Kastli, R., Schaettin, M., Egolf, L., Van Der Bourg, A., Bethge, P., Haenraets, K., Frézel, N., Topilko, T., Perin, P., Hillier, D., Hildebrand, S., Schueth, A., Roebroeck, A., Roska, B., Stoeckli, E.T., Pizzala, R., Renier, N., Zeilhofer, H.U., Karayannis, T., Ziegler, U., Batti, L., Holtmaat, A., Lüscher, C., Aguzzi, A., Helmchen, F., 2019. The mesoSPIM initiative: open-source light-sheet microscopes for imaging cleared tissue. Nat Methods 16, 1105–1108. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0554-0

Wang, S., Long, H., Hou, L., Feng, B., Ma, Z., Wu, Y., Zeng, Y., Cai, J., Zhang, D., Zhao, G., 2023. The mitophagy pathway and its implications in human diseases. Sig Transduct Target Ther 8, 304. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01503-7

Weber, M., Huisken, J., 2011. Light sheet microscopy for real-time developmental biology. Current Opinion in Genetics & Development 21, 566–572. https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.09.009

Webster, C., Blau, H.M., 1990. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: Implications for cell and gene therapy. Somat Cell Mol Genet 16, 557–565. https://doi.org/10.1007/BF01233096

Weigelin, B., Bakker, G.-J., Friedl, P., 2016. Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization. Journal of Cell Science jcs.152272. https://doi.org/10.1242/jcs.152272

Weigelin, B., Bakker, G.-J., Friedl, P., 2012. Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion: Principles of interface guidance and microvesicle dynamics. IntraVital 1, 32–43. https://doi.org/10.4161/intv.21223

Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Froehner, S.C., Allen, D.G., 2010. Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the mdx Mouse. PLoS ONE 5, e15354. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015354

Williams, R.M., Zipfel, W.R., Webb, W.W., 2005. Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. Biophysical Journal 88, 1377–1386. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047308

Willingham, T.B., Ajayi, P.T., Glancy, B., 2021. Subcellular Specialization of Mitochondrial Form and Function in Skeletal Muscle Cells. Front. Cell Dev. Biol. 9, 757305. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.757305

Wong, Y.C., Ysselstein, D., Krainc, D., 2018. Mitochondria–lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. Nature 554, 382–386. https://doi.org/10.1038/nature25486

Wu, Y., Wawrzusin, P., Senseney, J., Fischer, R.S., Christensen, R., Santella, A., York, A.G., Winter, P.W., Waterman, C.M., Bao, Z., Colón-Ramos, D.A., McAuliffe, M., Shroff, H., 2013. Spatially isotropic four-dimensional imaging with dual-view plane illumination microscopy. Nat Biotechnol 31, 1032–1038. https://doi.org/10.1038/nbt.2713

Wynn, T.A., Ramalingam, T.R., 2012. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. Nat Med 18, 1028–1040. https://doi.org/10.1038/nm.2807

Xiong, S., Mu, T., Wang, G., Jiang, X., 2014. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. Protein Cell 5, 737–749. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0089-1

Xu, C., Nedergaard, M., Fowell, D.J., Friedl, P., Ji, N., 2024. Multiphoton fluorescence microscopy for in vivo imaging. Cell 187, 4458–4487. https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.07.036

Yang, Z., Xu, H., Wang, J., Chen, W., Zhao, M., 2021. Single-Molecule Fluorescence Techniques for Membrane Protein Dynamics Analysis. Appl Spectrosc 75, 491–505. https://doi.org/10.1177/00037028211009973

Yew, E., Rowlands, C., So, P.T.C., 2014. Application of multiphoton microscopy in dermatological studies: A mini-review. J. Innov. Opt. Health Sci. 07, 1330010. https://doi.org/10.1142/S1793545813300103

Yin, H., Price, F., Rudnicki, M.A., 2013. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. Physiological Reviews 93, 23–67. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011

Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. Nat Rev Mol Cell Biol 12, 9–14. https://doi.org/10.1038/nrm3028

Youle, R.J., Van Der Bliek, A.M., 2012. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. Science 337, 1062–1065. https://doi.org/10.1126/science.1219855

Zhang, M., Niu, J., Xu, M., Wei, E., Liu, P., Sheng, G., 2024. Interplay between mitochondrial dysfunction and lysosomal storage: challenges in genetic metabolic muscle diseases with a focus on infantile onset Pompe disease. Front. Cardiovasc. Med. 11, 1367108. https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1367108

Zhao, X., Wang, L., Zhang, Y., Han, X., Deveci, M., Parmar, M., 2024. A review of convolutional neural networks in computer vision. Artif Intell Rev 57, 99. https://doi.org/10.1007/s10462-024-10721-6

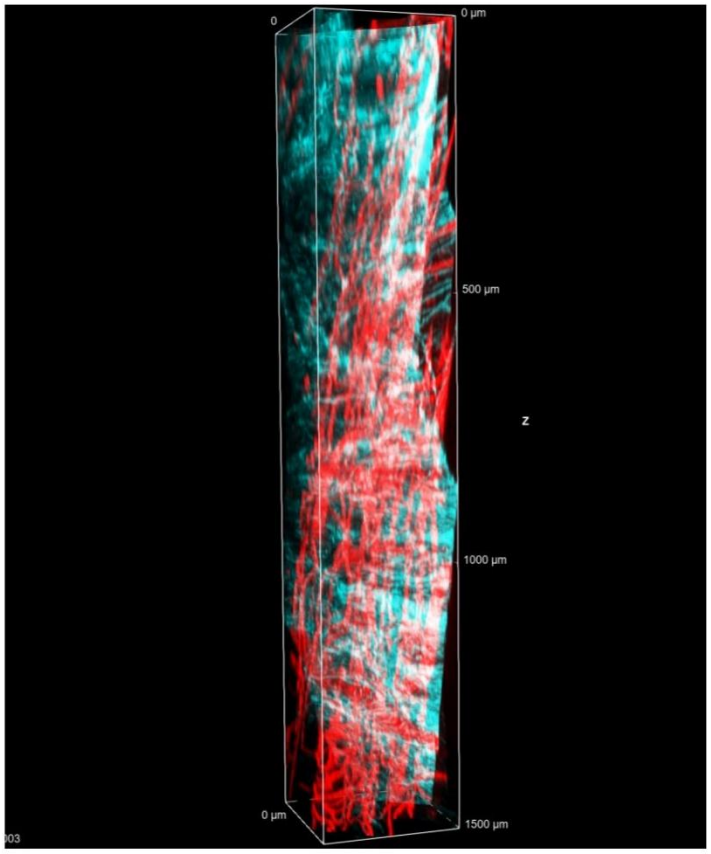
Zhou, Z., Siddiquee, M.M.R., Tajbakhsh, N., Liang, J., 2020. UNet++: Redesigning Skip Connections to Exploit Multiscale Features in Image Segmentation. IEEE Trans. Med. Imaging 39, 1856–1867. https://doi.org/10.1109/tmi.2019.2959609

Zipfel, W.R., Williams, R.M., Webb, W.W., 2003. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. Nat Biotechnol 21, 1369–1377. https://doi.org/10.1038/nbt899

Annexes

Annexe 1 : Application note Nikon sur l'analyse de vaisseau et la SHG

Comprehensive 3D workflow for fibrosis and vascular structure analysis



Vessel and SHG from collagen in skeletal muscle

Three-dimensional visualization of microvessels and SHG-collagen in iDISCO+/CUBIC-cleared Biceps femoris muscle from 1-year-old dystrophic (DMD^{mdx}) rat (0.265×0.265×1.5 mm^3) acquired using CFI75 Apo

25XC W 1300 (MRD77225)

Multiphoton imaging offers a range of modalities, including second harmonic generation (SHG), two-photon excited fluorescence (TPEF), and optical sectioning, enabling high-resolution three-dimensional imaging. However, the optical properties of biological tissues, such as light scattering and absorption, inherently limit imaging depth. Advances in tissue clearing techniques over recent decades have addressed these limitations, enabling the visualization of thick biological specimens. In this study, we employed a hybrid tissue clearing protocol combining iDISCO+ CUBIC, followed by multiphoton imaging using the A1-R HD25 multiphoton microscope (Figure 2). Leveraging AI-based segmentation, this approach allowed us to comprehensively characterize vascular networks and fibrosis in dystrophic skeletal muscle.

Study overview

- Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe and progressive muscle-wasting disorder caused by mutations in the DMD gene, which encodes the dystrophin protein [1]. The absence of dystrophin results in repeated cycles of muscle fiber degeneration and regeneration, culminating in the replacement of muscle tissue with fat and fibrotic tissue in both skeletal and cardiac muscles. Vascular abnormalities have also been observed as contributing factors to the disease progression, though the use of conventional 2D microscopy has limited the ability to fully characterize complex structures, such as blood vessels, within the affected tissues [2], [3]. In this study, multiphoton imaging was employed to overcome these limitations, enabling the simultaneous visualization of labeled vasculature using two-photon excited fluorescence (TPEF) and collagen-rich fibrotic tissue using second harmonic generation (SHG).

Multiphoton imaging

- Images were acquired using an excitation wavelength of 820 nm in resonant scanning mode. Autofluorescence signals in the green channel and fluorescence signals in the red channel were detected in reflection mode using band-pass emission filters (525/50BP for muscle fibers and 629/56BP for vasculature). Second harmonic generation (SHG) signals were captured in both reflection mode (bSHG) and transmission mode (fSHG) using a short band-pass filter (415/10BP). Each field of view (FoV) covered 297 µm × 297 µm per tile, scanned at a resolution of 1024 × 1024 pixels, resulting in a pixel size of 0.29 µm. For each Z-stack, a total of four tiles were acquired. Z-stack series were collected with a step size of 1 µm, spanning a depth of 350 µm within the specimen (Figure 2.b). The acquired tiles were stitched and reconstructed into three-dimensional datasets using NIS-Elements software (version 5.20)

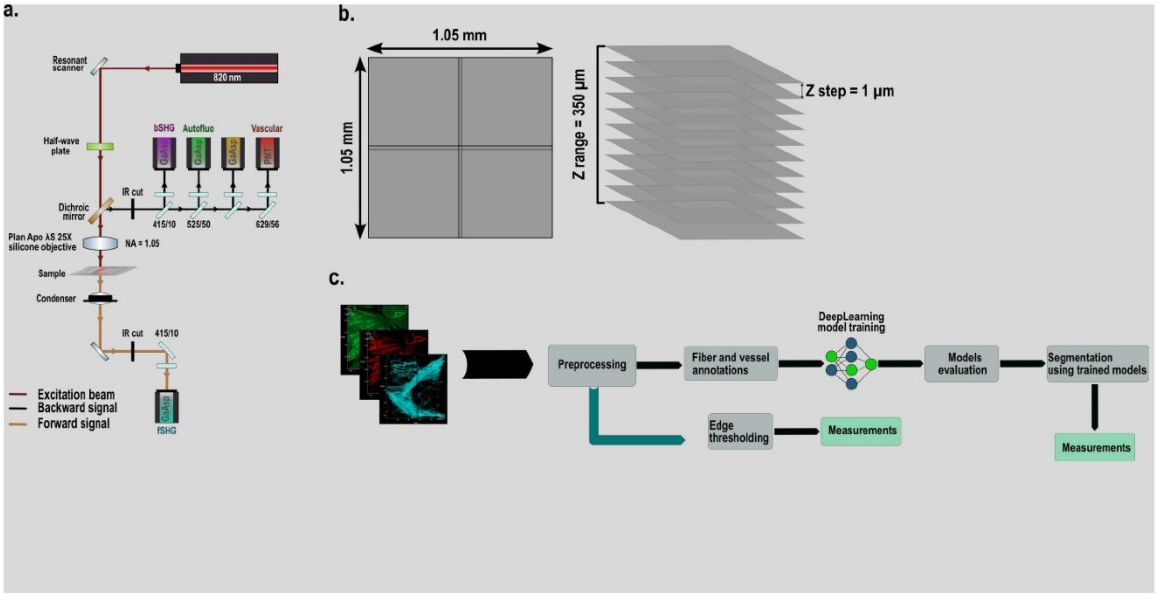


Figure 2: Schematic representation of the workflow from image acquisition to quantitative analysis. a. Multiphoton imaging setup: excitation was performed at 820 nm to simultaneously capture green autofluorescence from muscle fibers, second harmonic generation (SHG) from collagen, and vascular labeling with LEL-DyLight594. A Plan Apo Lambda S Silicone immersion objective 25X (MRD73250, NA=1.05) was used for high-resolution signal collection. SHG signal was detected in both forward and backward directions. b. Acquisition strategy: representative scheme of field-of-view tiling and Z-stacking for volumetric reconstruction of skeletal muscle tissue. C. Image analysis pipeline: steps from raw image pre-processing, segmentation, and 3D reconstruction to extraction of quantitative morphological and spatial descriptors of vasculature and fibrosis.

Image analysis pipeline

- Image analysis was performed using the General Analysis 3 (GA3) module within NIS-Elements software (version 6.10). Segmentation of muscle fibers was achieved through the deep learning module, "SegmentObject.ai," applied to the green autofluorescence channel. The training dataset consisted of seven cropped image volumes (400 × 400 × 10 µm), each containing 20 manually annotated muscle fibers. The training process involved a minimum of 2,500 iterations to optimize the segmentation model.
- Vasculature segmentation was performed using the "Segment.ai" module in NIS-Elements software. The training dataset comprised three image volumes (200 × 200 × 300 µm). Initial identification of vascular structures was carried out using thresholding, followed by manual refinement to generate accurate binary masks, which were used as ground truth for model training. The deep learning model was trained in two separate runs, each consisting of 500 iterations.
- Both segmentation models demonstrated high performance with minimal false positives, achieving precision values of 0.90 for the muscle fiber model and 0.92 for the microvessel model, respectively.

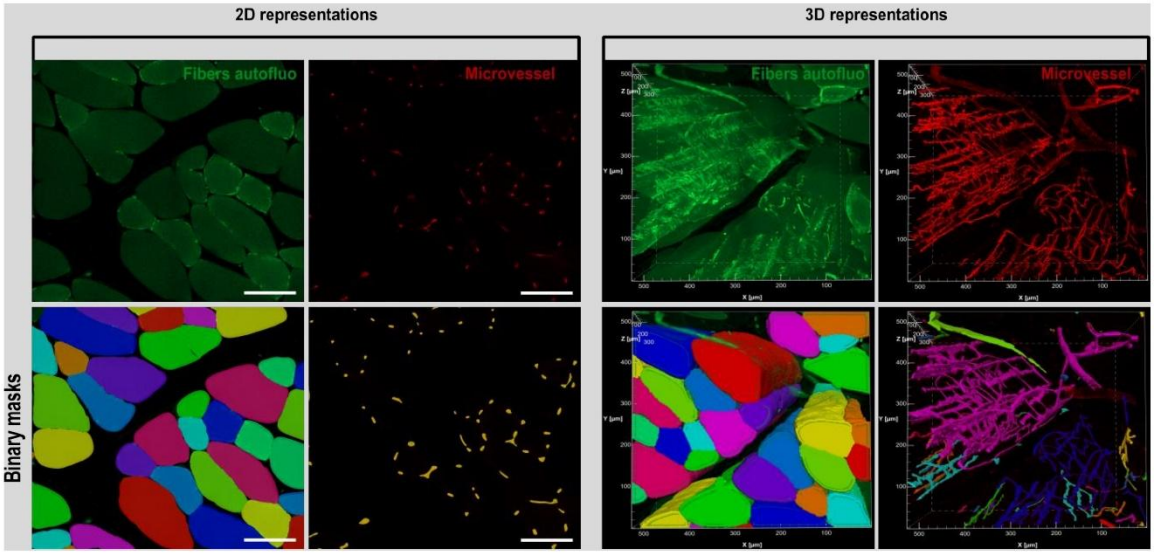


Figure 3: Two and three dimensional representation of skeletal muscle fibers and microvasculature. Green autofluorescence depicts muscle fibers, while red indicates microvessels segmented using the Segment.ai deep-learning algorithm. Left: 2D projection of raw and segmented data. Right: 3D rendering illustrating the spatial organization of vascular structures within the muscle tissue. Scale bar = 100 µm.

- A "denoise.ai," was applied to the SHG collagen signal to reduce noise. This was followed by the application of a Laplacian of Gaussian filter (Mexican Hat in GA3, σ = 2.7) to enhance the boundaries of SHG-collagen structures. Segmentation was then performed using an edge-based approach to accurately delineate collagen regions. The workflow are detailed in the published paper (*Hassani et al, 2025*)

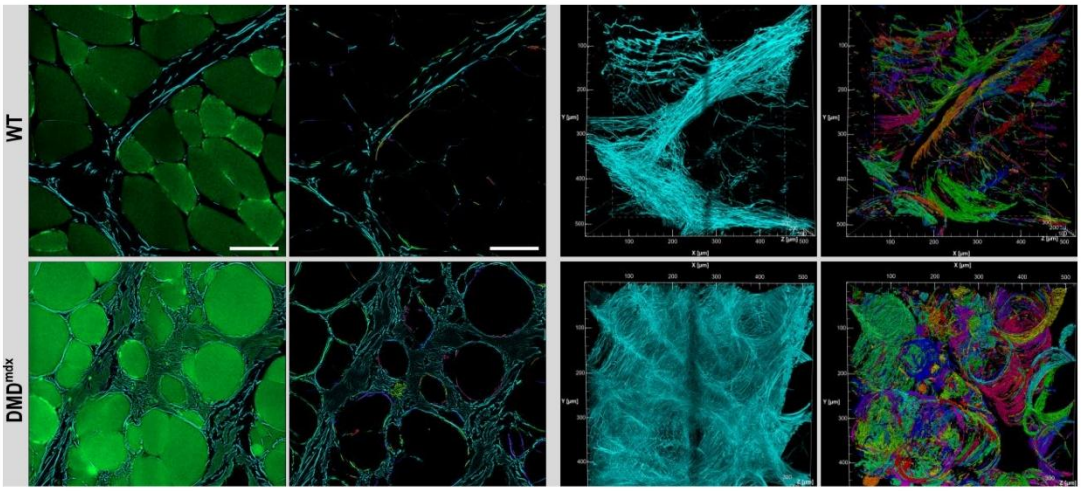


Figure 4 : Representation of skeletal muscle fibers and endomysial collagen. Green autofluorescence highlights muscle fibers, while forward second harmonic generation (SHG) signal depicts fibrillar collagen. The corresponding binary mask shows endomysial SHG signal segmented using the analysis pipeline. Scale bar = 100 µm.

Ibrahim HASSANI

CIFRE PhD Student at Nikon France Succursale
Nikon Europe BV in collaboration with
INRAE/Oniris UMR 0703

References

[1] D. Duan, N. Goemans, S. Takeda, E. Mercuri, and A. Aartsma-Rus, "Duchenne muscular dystrophy," 2021.
[2] L. Loufrani et al., "Absence of Dystrophin in Mice Reduces NO-Dependent Vascular Function and Vascular Density: Total Recovery After a Treatment with the Aminoglycoside Gentamicin," ATVB, vol. 24, no. 4, pp. 671–676, Apr. 2004, doi: 10.1161/01.ATV.0000118683.99628.42.
[3] F. Nguyen, L. Guigand, I. Goubault-Leroux, M. Wyers, and Y. Cherel, "Microvessel density in muscles of dogs with golden retriever muscular dystrophy," Neuromuscular Disorders, vol. 15, no. 2, pp. 154–163, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.nmd.2004.11.002.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the Boisbonne Center (Oniris, Nantes, France) for animal care and the APEX platform (INRAE/Oniris, Center of Excellence Nikon Nantes [CENN], Nantes, France, labellised IBISA, Biogenouest, Neuratris) from UMR 0703 PAnTher (INRAE/Oniris, Nantes, France) for their valuable technological support.

Titre : Exploration 3D de la fibre musculaire et de son environnement en contexte pathologique : développement d'un *workflow* de l'acquisition à l'analyse d'image pour une approche multi-échelle et multimodale

Mots clés : Multiphoton, super-résolution, analyse d'image, muscle squelettique

Résumé : L'exploration multi-échelle des tissus biologiques constitue un défi majeur pour comprendre les liens entre organisation macroscopique et altérations subcellulaires. Les maladies neuromusculaires, telles que la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et la maladie de Pompe, offrent un cadre d'étude privilégié pour développer des approches d'imagerie intégrées. Dans ce travail, nous combinons des techniques d'imagerie 3D profonde, de super-résolution et de transfert de repères afin d'étudier, dans un même continuum spatial, des phénomènes pathologiques allant de l'organe à l'organite. Dans un modèle de rat dystrophique, la microscopie multiphotonique appliquée à des échantillons musculaires transparisés a permis de générer une reconstruction 3D de la fibrose et du réseau vasculaire offrant l'opportunité de dégager des données quantitatives originales. Dans un modèle murin de la maladie de Pompe, l'exploitation de la microscopie super-résolution a pour sa part permis de caractériser des altérations mitochondriales et lysosomales en donnant accès à des données morphologiques et d'interactions subcellulaires. L'utilisation d'un *pipeline* corrélatif, basé sur un transfert de coordonnées entre microscopes droit et inversé, a rendu possible l'observation ciblée d'une même structure à différentes échelles. Cette approche intégrée propose un cadre méthodologique reproductible pour relier phénomènes tissulaires et cellulaire, ouvrant la voie à une compréhension plus fine des mécanismes pathologiques et transposable à un large ensemble de modèles biologiques.

Title: 3D exploration of muscle fibers and their microenvironment in pathological contexts: A workflow from acquisition to image analysis for multi-Scale, multimodal investigation

Keywords : Multiphoton, Super-resolution, Image analysis, skeletal muscle

Abstract: Multi-scale exploration of biological tissues is a major challenge for understanding the links between macroscopic organization and subcellular alterations. Neuromuscular disorders, such as Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Pompe disease, provide an ideal framework to develop integrated imaging approaches. In this work, we combine deep 3D imaging, super-resolution microscopy, and fiducial-based coordinate transfer to investigate pathological processes within a continuous spatial framework, from the organ to the organelle. In dystrophic rat model, multiphoton microscopy applied to optically cleared muscle samples enabled the generation of a 3D reconstruction of fibrosis and the vascular network, providing an opportunity to extract original quantitative data. In a mouse model of Pompe disease, the use of super-resolution microscopy has made it possible to characterize mitochondrial and lysosomal alterations by providing access to morphological data and subcellular interactions. The use of a correlative pipeline based on accurate coordinate transfer between upright and inverted microscopes, has made it possible to observe the same structure across scales. This integrated approach provides a reproducible methodological framework for linking tissue-level phenomena to cellular signatures, paving the way for a deeper understanding of pathological mechanisms and transferable to a wide range of biological models.