



microscopie de fluorescence par excitation à deux photons : application à des études de corrélations et de déclins de fluorescence en milieu biologique

Elvire Guiot

► To cite this version:

Elvire Guiot. microscopie de fluorescence par excitation à deux photons : application à des études de corrélations et de déclins de fluorescence en milieu biologique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2001. Français. NNT : . tel-00010025

HAL Id: tel-00010025

<https://pastel.hal.science/tel-00010025>

Submitted on 2 Sep 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° D'ORDRE :

UNIVERSITÉ PARIS XI UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THÈSE

présentée pour obtenir

**LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI ORSAY
Spécialité : Optique**

par

Elvire GUIOT

**Microscopie de fluorescence sous excitation à deux
photons : applications à des études de corrélations
et de déclins de fluorescence en milieu biologique.**

Soutenue le 21 décembre 2001 devant la commission
d'examen :

M.	Claude Boccara	Rapporteur
M.	Alain Brun	Directeur de thèse
M.	Patrick Georges	Invité
M.	Robert Pansu	Rapporteur
M.	Michel Robert-Nicoud	Examineur
Mme	Marie-Claire Schanne-Klein	Examineur

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I. MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE PAR EXCITATION A DEUX PHOTONS.....	5
I.1. LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE : DÉFINITIONS GÉNÉRALES.	6
I.1.1. Principes et caractéristiques de l'émission de fluorescence.	6
I.1.1.1. Le processus de photoluminescence.	6
I.1.1.2. Caractéristiques des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule.	8
I.1.1.3. Rendement quantique et temps de déclin de fluorescence.	9
I.1.1.4. Polarisation de la fluorescence.	11
I.1.1.5. Effets de l'environnement local sur la fluorescence.	12
I.1.1.6. Problèmes rencontrés lors de l'excitation d'une molécule : photo-blanchiment, photo-dégradation, saturation, effets thermiques.	12
I.1.2. Le microscope confocal de fluorescence : principe, performances et inconvénients.....	13
I.1.2.1. Le microscope confocal de fluorescence : principe.	14
I.1.2.2. Performances du microscope confocal de fluorescence : résolutions spatiales.	15
I.1.2.3. Problèmes rencontrés en microscopie confocale de fluorescence.	16
I.2. ÉMISSION DE FLUORESCENCE SOUS EXCITATION À DEUX PHOTONS.	17
I.2.1. L'absorption à deux photons.	17
I.2.2. L'émission de fluorescence sous excitation à deux photons.....	20
I.2.3. Le microscope de fluorescence par excitation à deux photons.	24
I.2.3.1. Principe du microscope de fluorescence par excitation à deux photons.	25
I.2.3.2. Performances du microscope de fluorescence par excitation à deux photons : résolutions spatiales.	26
I.2.3.3. Intérêts du microscope de fluorescence par excitation à deux photons pour l'étude de milieux biologiques.....	28
I.3. TECHNIQUES D'IMAGERIE EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	32
I.4. LA MICROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE PAR EXCITATION À DEUX PHOTONS.....	36
I.4.1. La microscopie de corrélation de fluorescence : définition.....	36
I.4.2. Principe de la microscopie de corrélation de fluorescence et détermination des constantes de diffusion.	37
I.4.3. Domaines d'application de la microscopie de corrélation de fluorescence.....	41
I.4.4. Comparaison avec les autres techniques de mesures des coefficients de diffusion.....	42
I.4.4.1. La diffusion quasi-élastique de la lumière.....	42
I.4.4.2. Méthode des chambres de diffusion.....	45
I.4.4.3. Méthode de retour de la fluorescence après photo-blanchiment.....	46
I.5. ANALYSE ET IMAGERIE DES DURÉES DE VIE DE FLUORESCENCE EN MICROSCOPIE BIPHOTONIQUE.....	48
I.5.1 Intérêts de l'imagerie des durées de vie de fluorescence.	48
I.5.2 Méthodes de mesures des durées de vie de fluorescence.	50
I.5.2.1. Mesure de durées de vie de fluorescence par fluorimétrie de phase.	50
I.5.2.2. mesures des durées de vie de fluorescence suite à une excitation impulsionnelle.....	54
I.5.3. Imagerie des durées de vie de fluorescence.	62
I.5.4. Domaines d'applications de l'analyse et imagerie de durée de vie de fluorescence.....	63
CHAPITRE II. MISE EN PLACE ET CARACTERISATION DE LA SOURCE LASER POUR L'EDP.....	68
II.1. LE LASER À SAPHIR DOPÉ AU TITANE.	69
II.2. LA DISPERSION DE LA VITESSE DE GROUPE : INFLUENCE SUR LA DURÉE DES IMPULSIONS ET COMPENSATION.	72
II.2.1. Le processus de dispersion de la vitesse de groupe.....	72
II.2.2. Compensation de la dispersion de la vitesse de groupe.....	76

II.3. MESURE ET CONTRÔLE DE LA DURÉE DES IMPULSIONS FEMTOSECONDES.....	79
II.3.1. Autocorrélation optique par génération de second harmonique.....	79
II.3.1.1. Autocorrélation optique par génération de second harmonique : principe.	79
II.3.1.2. Mesure de la durée des impulsions; influence de la dispersion de la vitesse de groupe introduite par un objectif de microscope.	85
II.3.2. Autocorrélation optique par absorption à deux photons dans une diode électroluminescente ou une photodiode.....	89
II.3.2.1. Principe et caractéristiques.....	89
II.3.2.2. Observation et compensation des effets de la vitesse de groupe introduite par un objectif de grande ouverture numérique.	90
II.3.3. Conclusions	92
 CHAPITRE III. MISE EN PLACE ET APPLICATIONS DE LA MICROSCOPIE DE CORRELATION DE FLUORESCENCE SOUS EDP.....	93
 III.1. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL DE MICROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE PAR EXCITATION À DEUX PHOTONS.	95
III.1.1. Montage expérimental.	95
III.1.2. Acquisition et traitement des données.	99
 III.2. FLUOROPHORES UTILISÉS POUR LES ÉTUDES EN MICROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE.....	102
III.2.1. Billes de latex fluorescentes.....	102
III.2.2. Molécules de FITC-dextran.	103
III.2.3. Green Fluorescent Protein (rGFP).....	105
III.2.4. Fluorescéine.....	108
 III.3. VÉRIFICATION DES CONDITIONS D'EXCITATION À DEUX PHOTONS POUR LA MICROSCOPIE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE.....	109
 III.4. CALIBRATION DU VOLUME D'EXCITATION.....	111
III.4.1. Calibration par imagerie de fluorescence	111
III.4.2. Calibration par mesure de corrélation de fluorescence.	113
 III.5. MESURES DE COEFFICIENTS DE DIFFUSION MOLÉCULAIRES EN SOLUTION : VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE CORRÉLATION DE FLUORESCENCE PAR EXCITATION À DEUX PHOTONS.	117
III.5.1. Mesures des coefficients de diffusion de molécules de FITC-dextran de différents poids moléculaires.....	117
III.5.2. Étude en corrélation de fluorescence de la rGFP.....	119
III.5.3. Étude en corrélation de fluorescence de la fluorescéine : détection de la molécule unique.	123
 III.6. APPLICATION DE LA MCF PAR EDP À LA CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES DE DIFFUSION AU SEIN DE BIOFILMS DE BACTÉRIES.....	125
III.6.1. Biofilms : définitions et contexte de l'étude en MCF par EDP.	125
III.6.2. Étude des mécanismes de diffusion au sein de biofilms de bactéries par MCF sous EDP.	129
III.6.2.1. Description des biofilms de bactéries utilisés.	129
III.6.2.2. Fluorophores utilisés pour les études de diffusion par MCF sous EDP au sein des biofilms.....	132
III.6.3. Diffusion de fluorophores au sein de biofilms de bactéries par MCF sous EDP- Résultats.....	135
III.6.3.1. Mesures de corrélation dans les biofilms de <i>L. lactis</i>	136
III.6.3.2. Mesures de corrélation dans les biofilms de <i>S. maltophilia</i>	138
III.6.3.3. Interprétation des résultats et discussion.....	140
 III.7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	145
 CHAPITRE IV. MISE EN PLACE ET APPLICATIONS DE L'IMAGERIE DE DURÉES DE VIE DE FLUORESCENCE SOUS EDP.....	147
 IV.1. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL POUR LA MESURE ET L'IMAGERIE DE DURÉES DE VIE DE FLUORESCENCE.....	148

IV.1.1. Dispositif expérimental pour la mesure de durées de vie de fluorescence.	149
IV.1.2. Traitement des données expérimentales.	152
IV.1.2.1. Principe.	152
IV.1.2.2. Acquisition de la réponse instrumentale de notre système de CPUCT sous une EDP.	154
IV.1.2.3. Détermination des durées de vie de fluorescence.....	157
IV.1.3. Dispositif expérimental pour l'imagerie.	160
IV.2. ÉTUDES <i>IN VITRO</i> DE L'ACTIVITÉ ANTITUMORALE DE LA CAMPTOTHÉCINE PAR MESURES DE FLUORESCENCE RÉSOLUES EN TEMPS SOUS EDP.	163
IV.2.1. La molécule de camptothécine.	164
IV.2.2. Contexte de notre étude sur l'activité antitumorale de la camptothécine.....	166
IV.2.3. Mesures de la fluorescence résolue en temps par CPUCT sous EDP de la CPT.	169
IV.2.3. Mesures de la fluorescence résolue en temps par CPUCT sous EDP de la CPT en présence de topoisomérase I.	172
IV.3. ÉTUDES <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> DE LA FLUORESCENCE RÉSOLUE EN TEMPS SOUS EDP D'UNE MOLÉCULE INHIBITRICE DU VIH : LA KHD 161.....	175
IV.3.1. La molécule KHD161.	176
IV.3.2. Contexte de notre étude de la fluorescence résolue en temps de la KHD 161.	177
IV.3.3. Mesures <i>in vitro</i> des durées de vie de la KHD 161 par CPUCT sous EDP.	179
IV.3.4. Imagerie <i>in vivo</i> de l'intensité et des durées de vie de fluorescence de la KHD 161.	181
IV.4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.	186
CONCLUSION GENERALE.....	189
REFERENCES.....	192
LISTE DE PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS A CONFERENCES.....	208

Introduction générale

Depuis plus d'un siècle, la microscopie de fluorescence est un outil couramment utilisé par les biologistes en raison de ses possibilités de détection *in-vivo* de particules et de structures qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique conventionnelle. En l'espace de quelques décennies, ce domaine de la microscopie s'est considérablement développé en raison de l'apparition de nouvelles technologies optiques. En particulier le microscope confocal de fluorescence, caractérisé par des capacités de résolutions spatiales tridimensionnelles de l'ordre du micromètre, est à l'origine de progrès considérables dans le domaine biomédical en permettant l'imagerie détaillée d'échantillons.

Suite au développement des sources laser impulsionsnelles femtosecondes, une nouvelle technique de microscopie de fluorescence non linéaire apparut en 1990 : **la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons** ou microscopie biphotonique [Denk 1990]. Caractérisé par une résolution spatiale tridimensionnelle comparable à celle du microscope confocal, le microscope biphotonique offre par ailleurs toute une série d'avantages supplémentaires pour l'étude d'échantillons biologiques, notamment en terme de limitation des photodommages. Ainsi, la microscopie biphotonique est devenue une technique alternative à la microscopie confocale de fluorescence pour l'imagerie non destructrice à haute résolution spatiale d'échantillons biologiques vivants. Ses capacités, déjà démontrées, permettent l'observation de l'arrangement spatial des constituants cellulaires ou la localisation d'entités fluorescentes et apporte ainsi d'importantes contributions à l'étude fonctionnelle des systèmes biologiques.

Néanmoins, les informations de structures et de localisation obtenues par imagerie de la fluorescence permettent difficilement de suivre les propriétés physico-chimiques et les interactions des composants cellulaires. L'étude de ces interactions à l'origine de la signalisation cellulaire constitue l'un des domaines les plus actifs de la recherche biologique et médicale. Dans ce contexte, trois laboratoires de l'Université Paris IX (laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, le laboratoire de Photophysique Moléculaire et le laboratoire de Chimie-Physique) se sont associés en 1998 pour donner naissance au projet IDÉFIX (Imagerie de la Dynamique d'Émission de Fluorescence par Interaction à X photons). L'objectif de ce projet était de poursuivre l'exploitation des performances de la microscopie biphotonique en développant un système complet d'imagerie combiné à de nouvelles techniques d'analyse résolue en temps de la fluorescence, qui permettra de corrélérer des propriétés réactionnelles avec des informations topologiques et structurales.

Le travail présenté dans cette thèse consiste en la mise en place de deux techniques complémentaires d'analyse de la dynamique d'émission de fluorescence sous une excitation à deux photons. Une première technique, **la microscopie de corrélation de fluorescence** (MCF) permet l'étude, avec la sensibilité de détection d'une molécule unique, de processus dynamiques qui se manifestent sur une échelle de temps de la centaine de nanosecondes à la milliseconde. Cette méthode permet typiquement l'analyse de processus de diffusion moléculaire et de durées de vie de divers processus non radiatifs (passage à l'état triplet, transfert de protons, modification de conformation d'une molécule, ...).

Une deuxième technique d'analyse résolue en temps de la fluorescence, **l'imagerie des durées de vie de fluorescence**, permet des mesures sur une échelle de temps variant typiquement de la picoseconde à quelques dizaines de nanosecondes. La durée de vie de fluorescence d'une molécule, ou durée de vie de l'état excité singulet, est un paramètre caractéristique de l'état physico-chimique de la sonde fluorescente étudiée. Elle renseigne donc sur de nombreuses propriétés moléculaires essentielles à la compréhension des mécanismes intracellulaires.

Le système que nous avons développé s'appuie donc sur des techniques récentes et originales, en pleine voie de développement, mais qui demeurent à ce jour encore peu exploitées, notamment dans le contexte de la microscopie de fluorescence non linéaire sous excitation à deux photons. Ainsi, dans un premier chapitre, nous introduirons les bases physiques et les principes des techniques utilisées dans le cadre de ce projet. Une description comparative des propriétés de l'émission de la fluorescence sous une excitation à un et deux photons sera notamment présentée. Nous exposerons d'autre part les divers avantages de la technique de microscopie biphotonique par rapport à son homologue en excitation linéaire, le microscope confocal de fluorescence. Une seconde partie de ce chapitre sera plus particulièrement consacrée à la description des techniques de microscopie de corrélation de fluorescence et d'imagerie des durées de vie de fluorescence de manière à situer notre projet par rapport à l'état de l'art actuel.

Le deuxième chapitre concerne les étapes de caractérisations préliminaires nécessaires à la mise en place du système de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons. Nous présenterons la source laser femtoseconde utilisée pour l'excitation à deux photons de la fluorescence : le laser à saphir dopé au titane, ainsi que plusieurs dispositifs expérimentaux développés dans le but de contrôler la durée des impulsions servant à l'excitation de la fluorescence.

Le troisième et le dernier chapitres concernent respectivement la mise en place du système de microscopie de corrélation de fluorescence et d'imagerie des durées de vie de fluorescence. Ces deux chapitres décriront les dispositifs expérimentaux réalisés et leurs performances. Nous présenterons les différentes étapes de validation des deux systèmes, grâce à l'étude *in vitro* de diverses molécules d'intérêt biologique. Les résultats concernant de premières études réalisées *in vivo* seront également présentés. Nous exposerons notamment une application originale de la microscopie de corrélation de fluorescence à l'étude de processus diffusionnels au sein de biofilms de bactéries (collaboration avec l'unité de Bioadhésion et d'Hygiène des Matériaux de l'INRA – Massy) ainsi que deux études réalisées en imagerie des durées de vie de fluorescence, de la réactivité d'une molécule antitumorale et d'une molécule inhibitrice du VIH, études qui s'inscrivent dans le domaine de la pharmacologie.

Chapitre I

Microscopie de fluorescence par excitation à deux photons

La théorie du processus non linéaire d'absorption à deux photons a été démontrée en 1931 [Göpper-Mayer 1931] puis vérifiée expérimentalement pour la première fois en 1961 [Kaiser 1961], suite à l'apparition des premières sources laser impulsives. Plus récemment, l'excitation à deux photons (EDP) fut utilisée dans le contexte de la microscopie de fluorescence [Denk 1990]. Cette nouvelle technique de microscopie non linéaire de fluorescence, caractérisée par des capacités d'analyse non destructive et d'imagerie tridimensionnelle à haute résolution spatiale devint alors une technique alternative à la microscopie confocale de fluorescence. Depuis cette découverte, la microscopie de fluorescence par EDP ou microscopie biphotonique est en phase de développement intense et est grandement plébiscitée en raison de ces avantages pour l'étude de milieux biologiques.

Ce chapitre exposera le principe et les diverses propriétés de cette nouvelle technique. Afin de mieux comprendre le rôle essentiel de l'étude de la fluorescence pour la compréhension de processus biologiques ou physico-chimiques, une première partie comportera un rappel des bases physiques et des définitions des caractéristiques générales du processus d'émission de fluorescence. Nous discuterons par ailleurs des divers avantages de la technique biphotonique par rapport à son homologue en excitation monophotonique : le microscope confocal de fluorescence.

Dans une deuxième partie, nous décrirons brièvement les différentes techniques d'imagerie à haute résolution spatiale de la fluorescence utilisées en microscopie confocale ou biphotonique de fluorescence et nous introduirons le principe des deux techniques d'analyse dynamique de l'émission de la fluorescence que nous avons développées dans le cadre de notre projet : la microscopie de corrélation de fluorescence et l'imagerie de temps de vie de fluorescence.

I.1. La microscopie de fluorescence : définitions générales.

I.1.1. Principes et caractéristiques de l'émission de fluorescence.

I.1.1.1. Le processus de photoluminescence.

La photoluminescence est un phénomène qui se traduit par l'émission de photons par une molécule qui a été irradiée par un faisceau lumineux. La photoluminescence englobe deux processus: la fluorescence et la phosphorescence, qui dépendent de la nature des états fondamentaux et excités de la molécule considérée. Le diagramme de Jablonski [Lakowicz 1983a], représenté sur la figure I.1.1 illustre l'absorption et l'émission de photons par une molécule.

Généralement, l'excitation de la plupart des molécules en solution s'effectue par absorption de photons dans une gamme de longueur d'onde s'échelonnant du visible à l'ultraviolet. La fluorescence est alors l'émission de photons qui se produit lors de la transition de la molécule de l'état électronique excité singulet S_1 vers l'état fondamental S_0 . Dans une telle transition, le spin électronique des molécules ne change pas d'orientation. La durée de vie de l'état excité S_1 d'une molécule fluorescente autrement appelée fluorophore, varie typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques nanosecondes. Dans le cas de la phosphorescence, processus que nous ne décrirons pas ici en détail, la transition s'effectue entre deux états d'énergie de multiplicité de spin différente. Les durées de vie de la phosphorescence s'échelonnent typiquement d'une centaine de microsecondes à quelques secondes.

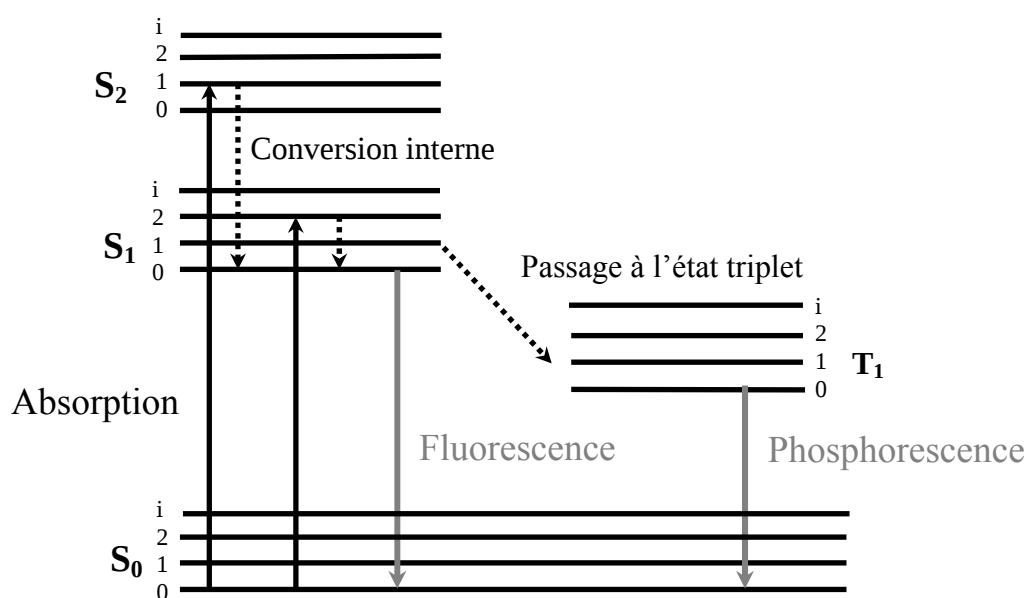


Figure I.1.1: diagramme de Jablonski.

S_0 , S_1 et S_2 désignent respectivement l'état fondamental singulet, le premier et le deuxième états excités singulets. T_1 est le premier état excité triplet. Pour chacun de ces états d'énergie plusieurs états vibrationnels notés 0, 1, 2, i... peuvent exister.

Plus précisément, le processus d'absorption d'un photon par une molécule amène un électron sur un niveau singulet S_1 ou S_2 . À température ambiante, la molécule retombe rapidement vers l'état de vibration le plus bas de S_1 : ce processus est appelé conversion interne.

Plusieurs évolutions sont alors possibles :

- la molécule retombe vers l'état fondamental S_0 et émet un photon de fluorescence,

- la molécule passe vers l'état triplet T_1 par une transition non radiative. Le retour de T_1 à S_0 peut s'accompagner de l'émission d'un photon de phosphorescence. Signalons que la probabilité de passage de S_1 vers T_1 est nettement plus faible que la désexcitation radiative S_1 vers S_0 ,

- la molécule revient dans son état fondamental sans émission de photons. Ces transitions non radiatives sont plus ou moins fréquentes en fonction de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule.

1.1.1.2. Caractéristiques des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule.

Les conversions internes qui se produisent lors de la désexcitation d'une molécule, sont à l'origine de pertes d'énergie entre les photons d'excitation et les photons d'émission. Ainsi, on remarque que la longueur d'onde centrale d'émission λ_E est toujours supérieure à la longueur d'onde centrale d'absorption λ_A . Ce phénomène est appelé déplacement de Stokes [Lakowicz 1983a] (figure I.1.2).

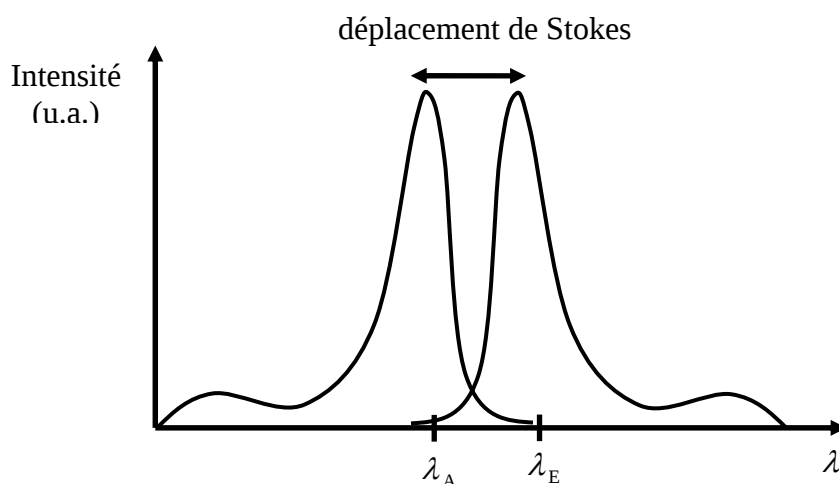


Figure I.1.2 : *profil caractéristique des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule.*

Généralement, le spectre d'émission de fluorescence est une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption. Ces spectres doivent être considérés en terme de distribution de probabilités de transition et sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules. Chaque molécule peut être définie par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres et qui reflètent les transitions énergétiques autorisées par le principe de Pauli.

Le déplacement de Stokes est une caractéristique importante : en effet, si ce déplacement est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres. La détection efficace du signal de fluorescence sans bruit parasite provenant de l'excitation sera alors compromise. De plus, si le recouvrement entre les deux spectres est important, une réabsorption des photons de fluorescence émis peut se produire et provoquer des distorsions dans le spectre d'émission.

L'effet « miroir » entre spectres d'excitation et d'émission n'est pas toujours observé : des dissimilitudes entre les deux spectres peuvent révéler l'existence de plusieurs formes de la molécule considérée, caractérisées par des longueurs d'onde d'absorption et/ou d'émission différentes.

I.1.1.3. Rendement quantique et temps de déclin de fluorescence.

Deux autres caractéristiques importantes de l'émission de fluorescence sont le rendement quantique et le temps de déclin de fluorescence. Le rendement quantique Q est défini comme le rapport entre le nombre de photons absorbés par la molécule et le nombre de photons de fluorescence émis. Le temps de déclin, ou durée de vie de fluorescence, correspond à la durée de vie de l'état excité.

Suite à l'absorption d'un photon, le retour d'une molécule excitée vers son état fondamental s'effectue par voie radiative (fluorescence) ou/et par divers processus de désexcitation non radiatifs. Ces deux types de processus sont caractérisés par une probabilité $k_0 = \tau_0^{-1}$ pour le processus d'émission de fluorescence et par une probabilité notée k_{nr} pour les processus non radiatifs (figure I.1.3).

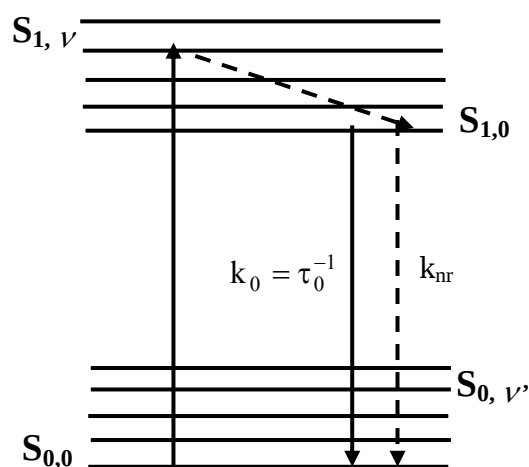


Figure I.1.3: déclin de fluorescence. Les traits en pointillés représentent les processus de désexcitation non radiatifs.

Nous considérerons dans la suite que k_{nr} englobe les probabilités de tous les processus non radiatifs, donc prend également en compte les processus de conversion interne et de passage vers l'état triplet.

Suivant ce schéma, suite à l'excitation, au temps $t=0$, d'une molécule par une impulsion, la fraction f^* du fluorophore qui est encore dans l'état excité au temps t est [Janin 1985]:

$$\frac{df^*}{dt} = -(k_0 + k_{nr}) f^*. \quad (I.1.1)$$

Cette équation conduit à une décroissance exponentielle de f^* et par conséquent à une décroissance exponentielle du nombre de photons émis.

L'intensité de fluorescence émise varie donc suivant la loi :

$$I_F(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right), \quad (I.1.2)$$

où $\tau_F = \frac{1}{k_0 + k_{nr}}$ est le temps de déclin ou temps de vie de fluorescence.

Le nombre total de photons émis est alors :

$$N_{ém} = \int_0^{\infty} I_F(t) dt = \tau_F I_0. \quad (I.1.3)$$

À l'instant $t = 0$, le nombre de molécules excitées est égal au nombre N_{ab} de photons absorbés.

L'intensité de fluorescence est dans ce cas :

$$I_0 = k_0 N_{ab}. \quad (I.1.4)$$

Le rendement quantique est alors :

$$Q = \frac{N_{ém}}{N_{ab}} = \frac{\tau_F}{\tau_0}. \quad (I.1.5)$$

On peut constater que le rendement quantique est proche de l'unité si les processus de désexcitation non radiatifs sont lents par rapport au processus d'émission de fluorescence, c'est à dire si $k_{nr} \ll k_0$. Dans ce cas, le temps de déclin de fluorescence est proche de la durée de vie radiative τ_0 . Tout processus qui accélère la désexcitation non radiative a pour effet de diminuer à la fois le temps de déclin de fluorescence et le rendement quantique.

Il est par ailleurs important de préciser que, souvent, le déclin de fluorescence d'une molécule ne peut pas être décrit par le modèle simple d'exponentielle décroissante présenté ci-dessus. En effet, s'il existe plusieurs espèces moléculaires dans l'échantillon étudié, le déclin de fluorescence devient multi-exponentiel.

D'un point de vue expérimental, la mesure de durées de vie de fluorescence est possible grâce à deux types de méthodes d'analyse de la fluorescence résolue en temps :

- soit par analyse du déclin de la fluorescence en fonction du temps suite à une excitation par une impulsion ultrabrève,
- soit par analyse du déphasage entre le signal de fluorescence et l'onde lumineuse excitatrice dont l'intensité est modulée sinusoïdalement.

Ces deux méthodes seront abordées avec plus de précision au paragraphe I.5.

1.1.1.4. Polarisation de la fluorescence.

Les fluorophores absorbent préférentiellement les ondes lumineuses dont le champ électromagnétique est parallèle à leur dipôle d'absorption. Si les molécules étaient immobiles, leur excitation par une lumière polarisée rectilignement donnerait naissance à une radiation polarisée dans la direction du dipôle d'émission de la molécule. Cependant, étant donné le phénomène de diffusion, et plus particulièrement la rotation des molécules, la fluorescence émise va se dépolariiser. Pour la plupart des molécules en solution, la rotation est beaucoup plus rapide que le temps de déclin de fluorescence et la fluorescence émise dans ce cas est totalement dépolariisée. Par contre, pour les macromolécules, comme par exemple les protéines, la rotation est plus lente et le temps de diffusion rotationnelle peut être déterminé par son degré de polarisation P ou par son anisotropie de fluorescence a , définis comme :

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}, \quad (I.1.6)$$

$$\text{et } a = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}, \quad (I.1.7)$$

où $I_{//}$ et $I_{\perp}$ sont respectivement les intensités de fluorescence mesurées en sélectionnant par un polariseur, la composante de polarisation parallèle ou perpendiculaire au champ électrique incident.

En effet, suite à une excitation de la fluorescence par une impulsion brève, l'anisotropie de fluorescence décline généralement de a_0 à 0, a_0 étant l'anisotropie au temps $t = 0$, c'est-à-dire

l'anisotropie en l'absence de cause de dépolarisation. Il a été démontré que, dans le cas d'une rotation isotrope, le déclin d'anisotropie en fonction du temps s'écrit [Valeur 1993] :

$$a(t) = a_0 \exp(-6D_r t), \quad (\text{I.1.8})$$

où D_r est la constante de diffusion rotationnelle.

I.1.1.5. Effets de l'environnement local sur la fluorescence.

Les différentes caractéristiques de l'émission de fluorescence : spectre, polarisation, rendement quantique et durée de vie de fluorescence ne constituent la signature d'une molécule que sous certaines conditions. En effet, ces paramètres dépendent fortement de l'environnement local de la molécule. Des changements plus ou moins importants peuvent se manifester sous l'effet de divers facteurs. Les plus courants d'entre eux sont le pH, la viscosité, la température, le potentiel électrique, la présence d'ions, d'oxygène ou les éventuelles interactions avec d'autres molécules [Valeur 1993]. Certaines molécules appelées sondes ou marqueurs fluorescents sont connues pour leur affinité spécifique pour un type de composants ou pour leur réaction à un état physico-chimique de leur environnement. Ces molécules sont grandement utilisées en biologie pour l'étude des structures et la compréhension des métabolismes cellulaires. Les applications liées à l'analyse de la fluorescence en biologie sont extrêmement nombreuses. Pour fixer les idées, nous en citerons quelques unes : mesure de pH ou de viscosité intracellulaire, localisation de canaux calciques ou potassiques, localisation des membranes et étude du potentiel électrique, état d'oxygénation...

I.1.1.6. Problèmes rencontrés lors de l'excitation d'une molécule : photo-blanchiment, photo-dégradation, saturation, effets thermiques.

Suite à son irradiation, une molécule à l'état excité a tendance à être plus réactive d'un point de vue chimique que dans son état fondamental [Rost 1992]. Des réactions irréversibles (polymérisations, oxydations, dissociations, isomérisations, liaisons avec d'autres molécules) peuvent se produire et donner naissance à des photo-produits. Ces nouvelles espèces créées sont souvent non fluorescentes ou caractérisées par des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence différents de ceux de la molécule initiale. Ces réactions photo-chimiques se traduisent par une perte progressive de l'intensité de fluorescence émise par un échantillon.

Cet effet est appelé processus de photo-blanchiment. Certaines espèces peuvent par ailleurs avoir une influence néfaste sur un milieu biologique vivant. On parle alors de photo-toxicité.

Un autre problème rencontré lors de l'excitation d'une molécule par un rayonnement intense est la saturation de l'état excité. Ce processus n'est pas en lui-même nécessairement destructif pour la molécule considérée. La variation de l'intensité de fluorescence émise dans des conditions de saturation ne varie plus linéairement avec l'énergie incidente et peut ainsi conduire à des erreurs d'interprétations des résultats obtenus. D'autre part, les effets de photo-blanchiment et de photo-dégradation seront d'autant plus importants que l'intensité incidente sera élevée.

Finalement, l'excitation d'une molécule par un rayonnement intense est à l'origine d'effets thermiques. Ces échauffements sont dépendants des capacités d'absorption des molécules et sont générés lors des différents processus de conversion interne. Ils ont évidemment un effet destructif sur la molécule et son environnement. Ces effets pourront être limités par diminution de l'intensité incidente.

L'excitation de la fluorescence d'une molécule par une radiation lumineuse peut donc conduire à une dégradation progressive plus ou moins rapide des molécules absorbantes et de leur environnement local. Ces processus de photo-dégradation dépendent des densités d'énergie incidente mais aussi des fluorophores utilisés et de la durée de l'irradiation. Les conditions d'excitation de la fluorescence sont donc à déterminer précisément de manière à s'affranchir le plus possible de ces effets.

I.1.2. Le microscope confocal de fluorescence : principe, performances et inconvénients.

Au cours du vingtième siècle, les méthodes d'analyse de la fluorescence, alliées aux techniques de microscopie, sont devenues un moyen d'étude très puissant en biologie. La microscopie de fluorescence permet en effet la détection *in-vivo* de particules et de structures qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique conventionnelle et révèle les processus métaboliques au sein de la cellule. Plusieurs techniques de microscopie de fluorescence, basée sur une excitation monophotonique (dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet), ont été développées dans ce but d'exploration d'entités biologiques :

- **la microscopie de fluorescence classique par transmission** : l'échantillon est entièrement illuminé par le faisceau exciteur. Le signal de fluorescence émis et transmis par l'échantillon est collecté par l'objectif de microscope. Cette méthode est peu utilisée en raison d'inconvénients majeurs. Comme on collecte le signal de fluorescence transmis à travers

l'échantillon, on est ici limité à l'étude d'échantillons extrêmement fins. Par ailleurs, un signal donné par la lumière excitatrice transmise viens s'ajouter au signal de fluorescence de l'échantillon dégradant la qualité du signal final. D'autre part, cette technique est caractérisée par une mauvaise résolution axiale. En effet, bien que la mise au point se fasse sur un plan focal précis, l'enregistrement de l'information est entaché d'un bruit de fond considérable qui se superpose à l'image du plan observé. Ce bruit résulte entre autre de l'excitation, par la source lumineuse, de tous les fluorophores situés sur le trajet du faisceau,

- **la microscopie à épi-fluorescence** : dans ce cas, la lumière excitatrice arrive au travers de l'objectif de microscope qui sert aussi à la collection de la fluorescence émise. Comme le mode de fonctionnement de ce type de microscope n'est plus en transmission, il est permis d'utiliser des échantillons plus épais. Toutefois, en raison des coefficients d'absorption élevés des composants biologiques dans les gammes de longueurs d'onde utilisées, il n'est possible d'étudier qu'une surface d'épaisseur limitée des échantillons. Comparé au cas du microscope de fluorescence par transmission, le signal détecté n'est plus perturbé par la lumière excitatrice. Cependant, les problèmes de résolution axiale subsistent,

- **la microscopie confocale de fluorescence** : cette technique est basée sur le microscope à épi-fluorescence sur lequel on a rajouté un trou de filtrage servant à bloquer tout signal ne provenant pas du plan focal. En raison de ses capacités de résolution tridimensionnelle, la microscopie confocale fut à l'origine d'améliorations considérables en microscopie de fluorescence. Nous décrirons ici en détail le principe, les performances et les limitations de cette technique.

1.1.2.1. Le microscope confocal de fluorescence : principe.

Le principe du microscope confocal a été proposé en 1957 [Minsky 1957, Minsky 1988], puis utilisé expérimentalement à partir de 1980 suite au développement de sources laser adaptées et aux progrès en instrumentation électronique et informatique. Avec l'apparition des premiers modèles commerciaux en 1987, la technique s'est très vite imposée comme l'outil indispensable en biologie en permettant l'observation de structures microscopiques dans des échantillons biologiques transparents épais tels que des cultures cellulaires ou des tranches de tissus [Terasaky 1995].

Le principe du microscope confocal est schématisé sur la figure I.1.4.

Suite à une excitation par une source lumineuse émettant généralement dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet, la fluorescence est excitée sur la quasi totalité du trajet du faisceau

dans l'échantillon. Ainsi, la fluorescence émise par les plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation constitue un signal indésirable. Afin d'éliminer la majorité de cette fluorescence parasite, un trou de filtrage est placé avant le détecteur dans le plan focal image de l'objectif de microscope. Ce trou permet ainsi d'obtenir une très bonne résolution axiale mais aussi d'améliorer les résolutions latérales. Le microscope confocal de fluorescence est ainsi caractérisé par des capacités de résolutions tridimensionnelles qui autorisent l'imagerie détaillée d'échantillons biologiques avec peu de bruit de fond.

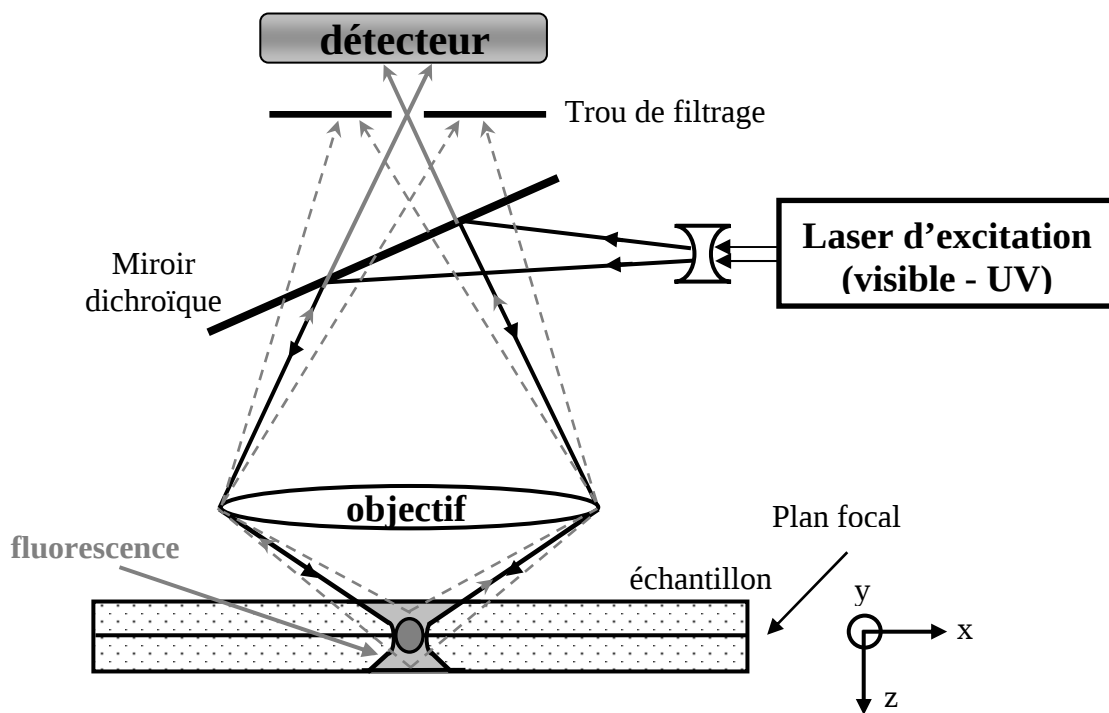


Figure I.1. 4 : le microscope confocal de fluorescence.

1.1.2.2. Performances du microscope confocal de fluorescence : résolutions spatiales.

Les limites de résolutions spatiales du microscope confocal sont directement liées à la taille du trou de filtrage. Toutefois, il sera nécessaire de trouver un bon compromis entre la résolution que l'on veut obtenir et la quantité de lumière atteignant le détecteur. Le diamètre optimal $\Phi_{\max}$ de ce filtre spatial est égal à la taille de l'image donnée par l'objectif du point de focalisation dans l'échantillon, soit :

$$\Phi_{\max} = \Phi_{\text{airy}} \gamma, \quad (\text{I.1.8})$$

avec γ le grandissement de l'objectif et Φ_{airy} le diamètre de la tâche d'Airy au foyer de l'objectif.

Dans ce cas, la limite de résolution radiale est égale à $\Phi_{\text{airy}}/2$. Par ailleurs, cette configuration permet la détection de la totalité de l'intensité de fluorescence qui provient du point de focalisation. À titre indicatif, des valeurs typiques de limites de résolutions en microscopie confocale sont présentées dans le tableau I.1.1.

ON	γ	Résolution radiale (μm)	Résolution axiale (μm)	ϕ_{max} (μm)
1,4	100x	0,15	0,58	43,6
1,4	63x	0,15	0,58	27,5
1,3	100x	0,16	0,67	46,9
0,75	40x	0,40	1,77	32,5

Tableau I.1.1 : limites de résolution spatiale du microscope confocal et diamètre maximal du trou de filtrage en fonction de l'ouverture numérique ON et du grandissement γ de l'objectif utilisé. Ces valeurs ont été obtenues pour une longueur d'onde excitatrice $\lambda = 500 \text{ nm}$ [Stelzer 1995].

Considérant ces propriétés, des images en deux dimensions avec de très bonnes résolutions peuvent être reconstruites point par point en translatant l'échantillon grâce à une platine à micro-déplacements ou par balayage laser. Des images en trois dimensions peuvent ensuite être générées en acquérant une série d'images dans des plans de focalisation successifs.

Néanmoins, le microscope confocal présente certains inconvénients.

1.1.2.3. Problèmes rencontrés en microscopie confocale de fluorescence.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant très proches, il est difficile de trouver un miroir dichroïque ayant une réflectivité maximale pour la longueur d'onde d'excitation et une transmission optimale pour la longueur d'onde de fluorescence, ce qui induit des pertes considérables de l'intensité de fluorescence détectée.

Des pertes supplémentaires sont dues à l'utilisation du trou de filtrage. La taille du trou doit être judicieusement choisie (diamètre proche de la valeur Φ_{max}) et l'alignement du montage doit être parfaitement réalisé afin de minimiser ces pertes.

Le microscope confocal nécessite l'emploi d'éléments optiques spécialement conçus pour l'ultraviolet permettant à la fois une transmission optimale de la lumière excitatrice avec une limitation des aberrations et une collection efficace de la lumière de fluorescence. Ce type d'objectif est relativement coûteux.

La fluorescence « parasite » émise par les plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation, ainsi que la lumière diffusée, constituent une source de bruit importante malgré l'utilisation du trou de filtrage.

L'intensité d'une onde électromagnétique se propageant dans un milieu absorbant décroît exponentiellement suivant la loi de Beer-Lambert : $I = I_0 \exp(-\varepsilon z)$, où I_0 est l'intensité initiale, ε le coefficient d'extinction molaire et z la distance parcourue dans le milieu. La plupart des composants biologiques ont des coefficients d'absorption élevés dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, ainsi la profondeur de pénétration dans des échantillons biologiques est très limitée ($< 50 \mu\text{m}$).

Le problème majeur lié à cette configuration est la dégradation très rapide des échantillons biologiques vivants sous un mode d'excitation monophotonique (photo-toxicité, photo-blanchiment, saturation, échauffement...). En effet, en raison des forts coefficients d'absorption des constituants biologiques dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, l'absorption et donc les photo-dommages ont lieu sur tout le trajet du faisceau, donc même en dehors de la zone d'étude.

La majorité de ces problèmes pourront être résolus par l'utilisation de la technique de microscopie de fluorescence par excitation à deux photons. Avant de décrire cette nouvelle technique, nous introduirons les bases physiques du processus non linéaire d'absorption à deux photons et les propriétés du signal de fluorescence émis suite à une telle excitation.

I.2. Émission de fluorescence sous excitation à deux photons.

I.2.1. L'absorption à deux photons.

Les ondes électromagnétiques interagissent avec la matière induisant une polarisation :

$$P = \chi^{(1)} E, \quad (\text{I.2.1})$$

où $\chi^{(1)}$ est la susceptibilité linéaire et E le champ électromagnétique incident.

Lorsque l'énergie incidente devient très intense, des phénomènes non linéaires se produisent et la polarisation s'écrit [Boyd 1992]:

$$P = \chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE + \chi^{(3)} EEE + \dots, \quad (\text{I.2.2})$$

où $\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$ sont les susceptibilités non linéaires du deuxième et du troisième ordre.

Nous considérerons ici la susceptibilité non linéaire d'ordre 3 qui peut s'écrire sous forme complexe :

$$\chi^{(3)} = \chi^{(3)'} + i\chi^{(3)''}. \quad (\text{I.2.3})$$

La partie réelle de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre intervient lors de processus se produisant sans échange d'énergie entre le champ appliqué et le milieu, comme par exemple, la génération du troisième harmonique ou l'autofocalisation. La partie imaginaire intervient lors de processus impliquant des transferts d'énergie avec le milieu, comme l'absorption à deux photons.

Il a en effet été démontré que la susceptibilité non linéaire du troisième ordre était le premier terme non linéaire capable de produire des combinaisons de fréquences correspondant à des transitions moléculaires [Göpper-Mayer 1931, Friedrich 1982]. Nous préciserons que des transitions multi-photoniques (absorption à trois, à quatre photons, etc...) qui mettent en jeu des susceptibilités non linéaires d'ordre supérieur sont également possibles. Les probabilités de transition étant dans ce cas extrêmement faibles (sections efficaces d'absorption à trois photons typiquement de $10^{-83} \text{ cm}^6 \cdot \text{s}/\text{molecule}/\text{photon}$) [Xu 1996b], ces processus d'absorption multiphotoniques ne sont que très peu utilisés expérimentalement à ce jour. Nous avons donc restreints notre étude à l'absorption à deux photons, processus non linéaire d'ordre 3.

Le processus d'absorption à deux photons est caractérisé par une section efficace d'absorption pouvant s'écrire sous la forme :

$$\delta = \frac{8\pi^2 h\nu}{n^2 c^2} \chi^{(3)''}, \quad (\text{I.2.4})$$

où $h\nu$ est l'énergie des photons incidents, n l'indice de réfraction du milieu et c la célérité de la lumière.

Il se traduit par l'absorption simultanée de deux photons d'énergie $h\nu_1$ et $h\nu_2$ via un niveau d'énergie virtuel, la somme des énergies ($h\nu_1 + h\nu_2$) étant supérieure ou égale à l'énergie de transition $h\nu_s$ dans la bande d'absorption (figure I.2.1).

La possibilité de telles transitions à deux photons a été théoriquement démontrée en 1931 [Göpper- Mayer 1931] et a été vérifiée expérimentalement pour la première fois en 1961, suite à l'invention des premières sources laser impulsionnelles. L'excitation à deux photons

de la fluorescence d'un cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{3+}$ [Kaiser 1961] confirma alors le fait que différentes règles de sélection pour l'absorption à deux photons permettent d'accéder à des transitions électroniques interdites lors des processus monophotoniques [McClain 1977]. Cette découverte suscita alors de nouveaux intérêts en spectroscopie notamment pour l'étude de la structure électronique des états excités des molécules et en microscopie de fluorescence.

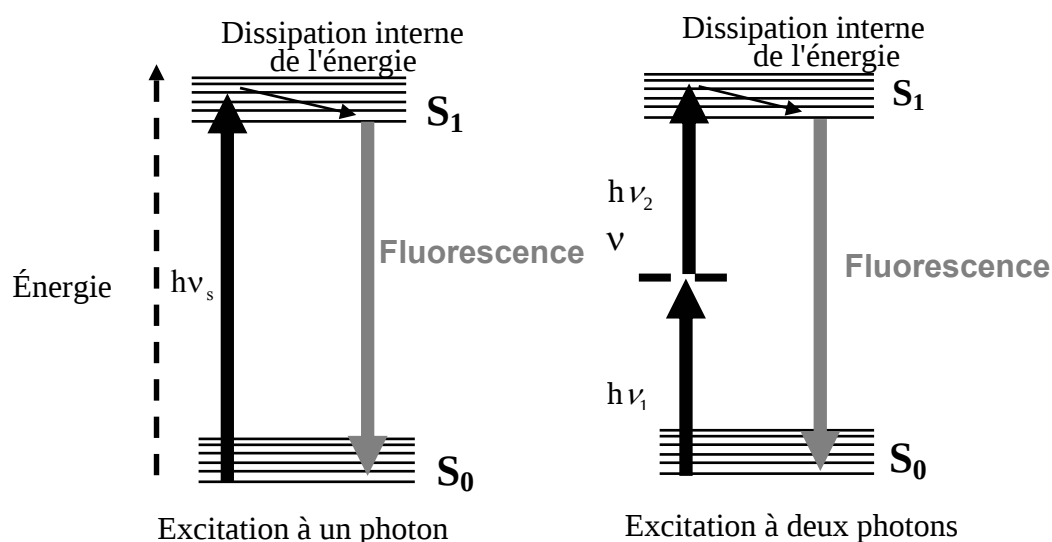


Figure I.2.1: émission de fluorescence sous excitation à un ou deux photons.

L'étude théorique des possibilités de transitions par absorption à deux photons est cependant délicate. En ce qui concerne les atomes isolés, une transition autorisée pour un processus à un photon sera strictement interdite dans le cas de l'absorption à deux photons et vice-versa. Néanmoins, cette propriété ne s'applique pas aux molécules, dont la géométrie est plus complexe. La possibilité d'absorption à deux photons a pu être constatée pour des molécules avec ou sans symétrie. Ainsi, aucune prédiction ne peut être effectuée à partir des spectres d'absorption monophotonique. L'étude théorique, par la mécanique quantique, des transitions autorisées devient par ailleurs très difficile et limitée pour les molécules complexes.

Nous n'aborderons pas ici la théorie quantique de l'absorption à deux photons mais nous nous limiterons à l'étude des propriétés de la fluorescence excitée grâce à ce processus. Dans ce but, nous effectuerons une comparaison entre le processus d'émission de fluorescence issue d'une excitation monophotonique et celui provoqué par une excitation à deux photons.

I.2.2. L'émission de fluorescence sous excitation à deux photons.

Dans le cas d'une absorption monophotonique et en absence de saturation et de photoblanchiment, le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume est :

$$N_{\text{absl}} = \sigma C F, \quad (\text{I.2.5})$$

où C est la concentration des fluorophores (en molécules/cm³), σ est la section efficace d'absorption à un photon (en cm²/molecule) et F est le flux de photons incident (photons/cm²/s).

Le flux de photons de fluorescence émis Fl_1 (photons/cm².s) est alors donné par [Fischer 1995] :

$$Fl_1 = KC\sigma Q d F, \quad (\text{I.2.6})$$

où K est une constante dépendant des conditions expérimentales (incluant l'efficacité de détection, la sensibilité du détecteur en fonction de la longueur d'onde, etc), d est la distance sur laquelle l'échantillon absorbe (en cm) et Q est le rendement quantique de fluorescence.

L'intensité de fluorescence émise varie donc ici linéairement avec l'intensité incidente.

La section efficace d'absorption à un photon est relativement élevée pour la plupart des molécules fluorescentes (de l'ordre de 10⁻¹⁷ cm²/molécule). L'excitation des molécules par un processus d'absorption monophotonique s'effectue généralement grâce à des sources continues de lumière visibles ou UV, par exemple, des lasers à argon ou des lampes à vapeur de mercure. Des sources impulsionnelles sont aussi utilisées pour des études de fluorescence résolues en temps.

Notons qu'une molécule est plus généralement caractérisée par son coefficient d'extinction molaire ε (mole⁻¹cm⁻¹) que par sa section efficace d'absorption, les deux paramètres étant reliés par la relation suivante :

$$\sigma = 2,3 \varepsilon \frac{M}{C}, \quad (\text{I.2.7})$$

où M est le nombre total de moles contenues dans la solution étudiée .

Dans le cas d'une excitation à deux photons (EDP), il a été démontré que le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume variait de manière quadratique avec l'intensité incidente [Fischer 1995], donc :

$$N_{\text{abs}2} = \delta C F^2, \quad (\text{I.2.8})$$

où δ est la section efficace d'absorption à deux photons (en $\text{cm}^4 \cdot \text{s} / \text{molecule} / \text{photon}$).

Le flux de photons de fluorescence émis, Fl_2 , est dans ce cas :

$$Fl_2 = KC \frac{Q}{2} \delta d F^2. \quad (\text{I.2.9})$$

Le rendement quantique de fluorescence est ici divisé par 2 étant donné que deux photons sont absorbés pour chaque photons émis.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons sont généralement très faibles. En effet, elles sont typiquement de l'ordre de $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} / \text{molécule} / \text{photon}$. À titre d'exemple, la figure I.2.2 représente les spectres d'absorption à un ou à deux photons de la fluorescéine. On constate ici que dans le cas de l'absorption à deux photons, le spectre est beaucoup plus étendu que dans le cas d'une absorption monophotonique, caractéristique généralement observée sur toutes les molécules étudiées jusqu'à présent [Xu 1996 a et b, Albota 1998 a et b, Fischer 1995].

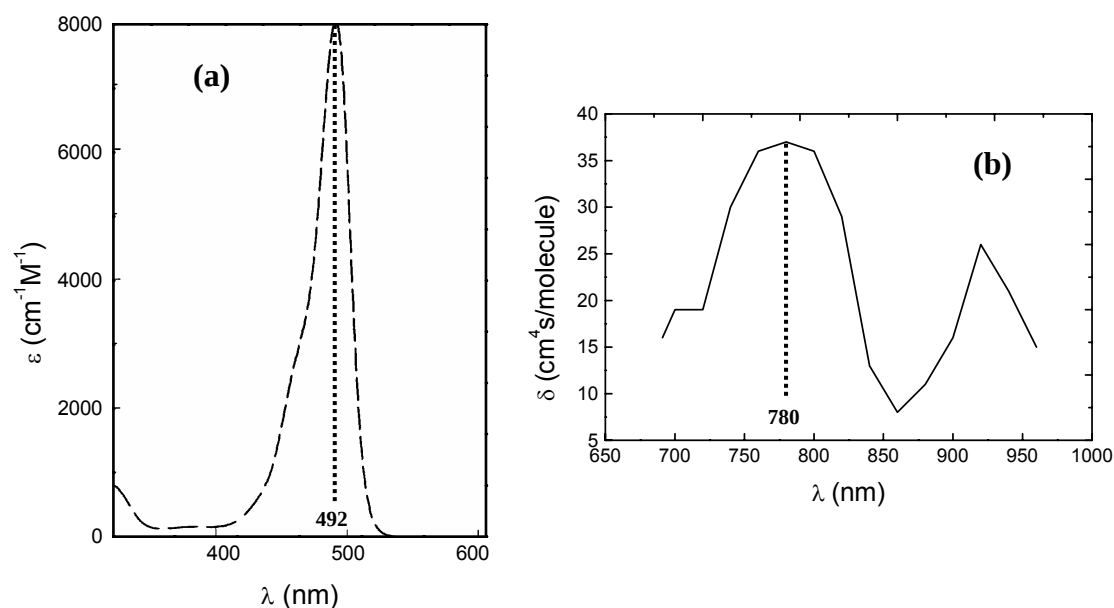


Figure I.2.2 : (a) coefficient d'absorption monophotonique [Martin 1975] et (b) section efficace d'absorption à deux photons [Albota 1998a] en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour la fluorescéine dans l'eau (pH=12).

Les deux spectres révèlent par ailleurs des propriétés d'absorption de la molécule très différentes suivant le mode d'excitation, et attestent des différences existant entre les règles de sélections pour les deux types de transitions énergétiques. En particulier la longueur

d'onde correspondant à une absorption biphotonique optimale n'est pas, comme on aurait pu s'y attendre, le double de la longueur d'onde d'absorption monophotonique maximale.

À titre indicatif, les longueurs d'onde λ_{abs1} et λ_{abs2} d'absorption maximale pour les processus monophotonique et biphotonique sont présentées pour quelques molécules courantes dans le tableau I.2.1.

	λ_{abs1} (nm)	λ_{abs2} (nm)
Bodipy	503	920
Cascade Blue	400	750
DAPI	350	700
Fluorescéine	492	780
Indo-1	350	700
Lucifer Yellow	430	860
Rhodamine B	545	840
Rhodamine 6G	526	795

Tableau I.2.1 : longueurs d'onde λ_{abs1} et λ_{abs2} d'absorption maximale de fluorophores courants pour un processus monophotonique et biphotonique.

Nous n'indiquons pas dans ce tableau les valeurs des sections efficaces d'absorption biphotonique mesurées, les résultats publiés n'étant pas toujours concordants entre eux. Les sections efficaces d'absorption à deux photons sont généralement estimées expérimentalement en mesurant le flux de photons de fluorescence émis en fonction du flux de photons incidents et de la longueur d'onde d'excitation. Ces mesures sont dépendantes du système expérimental et les valeurs trouvées peuvent varier en fonction de la configuration du montage (changement de sensibilité du détecteur et variation de la puissance moyenne incidente et de la durée des impulsions en fonction de la longueur d'onde, ...).

Notons que les données concernant les sections efficaces d'absorption à deux photons sont relativement rares et que la majorité des études ont été menées sur des molécules de type xanthènes (fluorescéine, rhodamines, etc) ou coumarines.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons étant relativement faibles, certaines conditions sont à respecter afin d'obtenir une excitation optimale de la fluorescence. Considérant la relation I.2.9, le flux de photons incidents doit être très élevé afin d'obtenir une bonne efficacité d'excitation de la fluorescence. L'utilisation de sources laser continues

est alors possible mais il a été démontré que dans ce cas, les puissances moyennes incidentes mises en jeu devaient être très élevées (au moins supérieures d'un facteur 100 à 1000 par rapport aux puissances émises par un laser impulsionnel femtoseconde). L'utilisation de sources continues est donc totalement inadaptée à l'étude d'échantillons biologiques et l'excitation à deux photons de la fluorescence s'effectue plus généralement grâce à des sources laser impulsionnelles femtosecondes (parfois picosecondes).

Pour des impulsions de profils temporel et spatial gaussiens, l'intensité en un point de coordonnées (x,y,z) et au temps t est :

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{z_0^2}\right) \exp\left(-\left(\frac{t}{\Delta\tau}\right)^2\right), \quad (\text{I.2.10})$$

avec ω_0 le rayon de col du faisceau et $\Delta\tau$ la durée des impulsions.

Nous nous placerons pour la suite du calcul dans le plan d'intensité maximale, c'est-à-dire pour $z = 0$.

L'énergie par impulsion peut être exprimée de la manière suivante :

$$E = \frac{P}{f} = \iint I dS dt, \text{ avec } dS = dx dy, \quad (\text{I.2.11})$$

où P est la puissance moyenne et f la fréquence des impulsions.

Après calcul, on a :

$$E = \pi\sqrt{\pi} I_0 \frac{\omega_0^2}{2} \Delta\tau. \quad (\text{I.2.12})$$

D'où :

$$I_0 = \frac{2}{\pi\sqrt{\pi}} \frac{P}{f} \frac{1}{\Delta\tau \omega_0^2}. \quad (\text{I.2.13})$$

Le flux maximal de photons incidents alors :

$$F_{\max} = \frac{I_0 \lambda}{hc} = \frac{2}{\pi\sqrt{\pi}} \frac{P}{f} \frac{\lambda}{hc} \frac{1}{\Delta\tau \omega_0^2}. \quad (\text{I.2.14})$$

Cette équation montre clairement que le flux de photons incidents sera d'autant plus élevé que la durée des impulsions et le rayon de col du faisceau seront faibles. On utilisera donc des

sources laser impulsionnelles dont on focalisera le rayonnement grâce à des objectifs de microscope de grande ouverture numérique.

En effet, lorsqu'un faisceau laser est focalisé par une lentille, la taille minimale du point de focalisation est le diamètre ϕ_{airy} de la tâche d'Airy (limite de diffraction) :

$$\phi_{\text{airy}} = 1,22 \frac{\lambda}{\text{ON}} \approx 2\omega_0, \quad (\text{I.2.15})$$

ON étant l'ouverture numérique.

Nous insisterons ici sur l'importance de la durée des impulsions et du rayon de col du faisceau au point focal de l'objectif. En effet, d'après les équations I.2.14, I.2.8 et I.2.9, le nombre de photons absorbés et donc le flux de fluorescence émise sont inversement proportionnels à $\Delta\tau^2$ et ω_0^4 . On utilise typiquement pour les expériences d'absorption à deux photons des lasers à saphir dopé au titane émettant dans le proche infrarouge ($690 \text{ nm} < \lambda < 1000 \text{ nm}$) des impulsions d'environ 100 femtosecondes.

I.2.3. Le microscope de fluorescence par excitation à deux photons.

La microscopie de fluorescence par EDP est une technique récente. En effet, les possibilités d'imagerie de la fluorescence par excitation à deux photons ont été démontrées pour la première fois en 1990 [Denk 1990] avec un laser rouge ($\lambda = 630 \text{ nm}$) impulsionnel femtoseconde à colorant fonctionnant sur le principe du verrouillage de modes passif. La technique s'est ensuite développée rapidement suite à l'apparition des sources laser femtosecondes à cristaux solides, plus stables et mieux adaptées. Plus précisément, le laser femtoseconde à saphir dopé au titane (décrit au chapitre II) s'imposa comme le candidat idéal pour la microscopie biphotonique. En raison de son d'accordabilité en longueur d'onde de 690 à 1000 nm, l'excitation de toute molécule dont le spectre d'absorption est situé dans le domaine de longueur d'onde 345 nm à 500 nm sera possible. Aujourd'hui, ces sources, couramment commercialisées (Coherent, Spectra-Physics, Time Bandwidth Product), sont compactes et simples à utiliser d'où un développement considérable de la microscopie de fluorescence par EDP pour des applications biologiques. En effet, le microscope biphotonique est caractérisé par des résolutions spatiales tridimensionnelles comparables à celles du microscope confocal mais présente des avantages supplémentaires pour les études *in-vivo*, avantages que nous présenterons dans le paragraphe suivant.

1.2.3.1. Principe du microscope de fluorescence par excitation à deux photons.

Globalement, le principe du microscope de fluorescence par EDP est similaire à celui du microscope confocal (figure I.2.3).

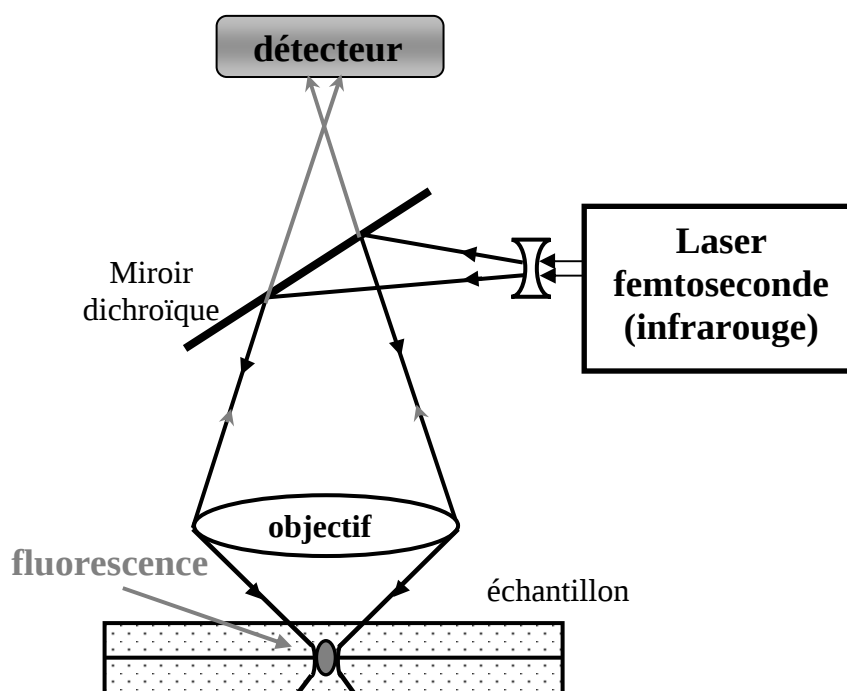


Figure I.2.3 : schéma de principe du microscope de fluorescence par excitation biphotonique.

Il « suffit » de remplacer le laser d'excitation visible ou UV par un laser impulsif femtoseconde émettant dans l'infrarouge. Étant données les faibles probabilités de transitions à deux photons et conformément à la relation I.2.6, l'émission de fluorescence n'a lieu qu'au point où la densité de photons est la plus élevée autrement dit, la fluorescence n'est excitée qu'au voisinage du point focal de l'objectif de microscope. Ce point est illustré sur la figure I.2.4 : si l'excitation est linéaire (absorption monophotonique), la fluorescence est excitée sur la totalité du trajet du faisceau alors que dans le cas d'une EDP, la fluorescence est confinée en un point. Le trou de filtrage présent dans le microscope confocal peut ainsi être supprimé. La génération du signal étant confinée au point focal, il suffit de collecter à chaque instant la totalité de la fluorescence émergeant de l'échantillon.

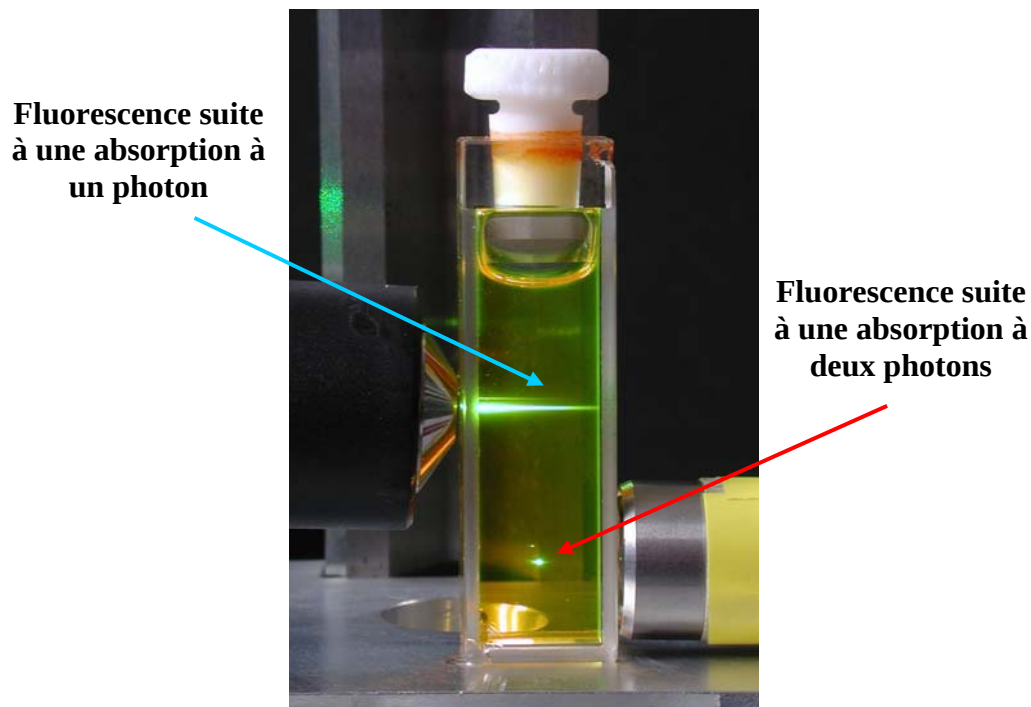


Figure I.2.4 : illustration du confinement intrinsèque de la fluorescence par EDP. L'échantillon fluorescent utilisé est une solution de fluorescéine excitée à un photon par une lampe à vapeur de mercure et à deux photons par un laser à saphir dopé au titane.

1.2.3.2. Performances du microscope de fluorescence par excitation à deux photons : résolutions spatiales.

La propriété fondamentale du microscope de fluorescence par EDP est sa très grande résolution spatiale dans les trois dimensions. En effet, le confinement de l'excitation au point de focalisation de l'objectif de microscope définit intrinsèquement un volume d'excitation très petit. Les caractéristiques de ce volume ont été données par plusieurs auteurs.

Nous rappellerons ici le résultat pour une répartition spatiale de l'intensité gaussienne au foyer d'un objectif de grande ouverture numérique ($ON > 0,8$) [Mertz 1998]. Il a en effet été montré que, pour un faisceau couvrant entièrement la pupille d'entrée de l'objectif, l'approximation gaussienne était la plus appropriée.

Si l'on exprime le profil d'intensité de la manière suivante :

$$I(x, y, z) = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{\omega_z^2}\right), \quad (\text{I.2.16})$$

le volume d'excitation est alors :

$$V = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} \omega_0^2 \omega_z, \quad (\text{I.2.17})$$

avec

$$\begin{cases} \omega_0 \approx 0,52\lambda / \sin \alpha, \\ \omega_z \approx 0,76\lambda / (1 - \cos \alpha), \end{cases} \quad (\text{I.2.18})$$

où λ est la longueur d'onde d'excitation et α le demi-angle d'ouverture de l'objectif.

Pour un objectif d'ouverture numérique 1,4, les résolutions radiale et axiale respectivement seront d'environ de 0,4 μm (valeur proche de la limite de diffraction égale à 0,35 μm) et de 0,9 μm , valeurs calculées pour une longueur d'onde de 800 nm. La résolution est donc ici légèrement moins bonne que dans le cas du microscope confocal (tableau I.1.1), en raison principalement des longueurs d'onde utilisées qui sont deux fois plus grandes qu'en excitation à un photon.

Notons que les résolutions pourraient être améliorées grâce à l'utilisation, comme dans le cas du microscope confocal, d'un trou de filtrage. En raison des problèmes d'alignement et de pertes de flux collecté, cette solution est peu utilisée. D'autres méthodes existent dans le but d'améliorer les résolutions spatiales et plus particulièrement la résolution axiale, comme la technique 4Pi [Lindek 1995] que nous ne décrivons pas en détail ici. Brièvement, le principe consiste à utiliser pour l'excitation ou/et pour la détection deux objectifs disposés de part et d'autre de l'échantillon de manière à ce que leurs points focaux soient parfaitement superposés. Les ondes lumineuses interfèrent donc dans la région focale donnant naissance à une modulation de l'intensité. Le volume d'excitation est alors délimité par la figure d'interférences. Considérant le premier maximum de cette figure, la résolution axiale obtenue est améliorée d'un facteur quatre à cinq, cependant des maxima secondaires sont présents le long de l'axe optique définissant un volume d'excitation de géométrie complexe. De plus, cette configuration requiert des alignements très précis et contraignants et est limitée à l'étude d'échantillons fins.

Ainsi, dans la plupart des applications, on utilise la configuration simple du microscope à deux photons conformément à la figure I.2.3, les résolutions spatiales obtenues dans ce cas étant largement satisfaisantes.

1.2.3.3. Intérêts du microscope de fluorescence par excitation à deux photons pour l'étude de milieux biologiques.

Considérant le principe de fonctionnement du microscope de fluorescence par EDP, il apparaît immédiatement que la configuration, et donc la mise en œuvre du système est relativement simple étant donnée l'absence du trou de filtrage requis dans la configuration confocale. Le microscope de fluorescence biphotonique étant caractérisé par de très bonnes résolutions spatiales dans les trois dimensions, il devient une technique alternative à la microscopie confocale et offre par ailleurs divers avantages supplémentaires [König 1996a, Brakenhoff 1996] que nous décrivons ci-dessous.

(1) Peu (voire pas) de bruit de fond.

La génération de la fluorescence ne se produisant qu'au point focal, aucun signal parasite ne provient des plans inférieurs et supérieurs au plan focal. Cette propriété du microscope biphotonique autorise, grâce à l'absence de trou de filtrage, une détection de la totalité de la fluorescence avec très peu de bruit de fond.

(2) Longueurs d'onde d'excitation et d'émission bien séparées.

La longueur d'onde d'émission de fluorescence suite à un processus d'excitation biphotonique est quasiment le double de la longueur d'onde d'excitation. Il est donc très facile, à la détection, de séparer efficacement le signal de fluorescence émis du rayonnement excitateur incident au moyen de filtres appropriés. D'autre part, cette configuration permet de s'affranchir du bruit qui provient de la lumière diffusée par l'échantillon (dont la longueur d'onde est proche de celle de l'excitation). Ceci est un avantage considérable lors d'études à travers des milieux diffusants tels que des tissus.

(3) Amélioration de la profondeur de pénétration.

Les coefficients d'absorption de la plupart des composants biologiques sont plus faibles dans l'infrarouge que dans l'ultraviolet. Il en résulte une meilleure profondeur de pénétration du faisceau laser dans les échantillons (au moins double de celle obtenue en microscopie confocale). Cet avantage majeur a déjà été vérifié expérimentalement et exploité pour l'étude de divers échantillons épais [Centonze 1998, Vroom 1999].

(4) Dégradation des échantillons réduite.

Le principal avantage du microscope de fluorescence par EDP est la restriction des éventuels dommages au point de focalisation, due à la localisation de l'excitation. Les divers problèmes

exposés au paragraphe I.1.1.6 rencontrés lors de l'excitation d'une molécule : effets thermiques, photo-blanchiment, création de photo-produits, photo-dégradation seront ainsi limités au micro-volume de focalisation. Ceci constitue déjà un avantage non négligeable en comparaison de la microscopie confocale. Cependant il reste à étudier dans quelles mesures l'EDP n'est pas localement plus destructrice en raison des très fortes densités de puissance utilisées en régime femtoseconde à haute cadence (puissance crête de l'ordre du TW/cm²).

Les dommages causés suite à une EDP sont difficiles à estimer, ceux-ci dépendant de nombreux paramètres tels que la concentration et le type de fluorophore utilisé, la longueur d'onde et la densité de puissance incidente, et bien sûr le type d'échantillon étudié. Peu d'études systématiques ont été publiées dans ce contexte. Il existe tout de même quelques études quantitatives complètes des dommages induits par une excitation multiphotonique définissant les paramètres à contrôler pour des applications particulières telles que l'imagerie de fluorescence de l'activité calcique en milieu cellulaire (neurones) [Koester 1999] ou les effets de l'excitation de molécules photosensibles utilisées en thérapie photodynamique sur l'ADN [Shafirovich 1999]. Afin de tenter de préciser ces effets de dommages, nous effectuerons ici une synthèse de divers résultats publiés analysant les problèmes et dégradations causées par une EDP.

Effets de saturation.

Les effets de saturation de l'état excité dépendent bien sûr de la section efficace d'absorption du fluorophore et du flux de photons incident. La première étude de microscopie de fluorescence effectuée par Denk et al. en 1990 révéla que le seuil de puissance moyenne avant saturation était d'environ 50 mW pour une molécule dont la section efficace d'absorption à deux photons était de $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s/photon/molecule}$ (impulsions de 100 fs de durée à la cadence de 80 MHz focalisées par un objectif d'ouverture numérique 1,4). En comparaison, l'effet de saturation, suite à une excitation monophotonique, apparaît pour des puissances moyennes de même ordre de grandeur. La fréquence des impulsions est par ailleurs un paramètre important. En effet, le nombre de photons absorbés par unité de temps peut être amélioré en augmentant la fréquence mais celle-ci doit être suffisamment faible pour permettre aux molécules excitées de se relaxer entre deux impulsions consécutives. Une fréquence de 80 MHz, correspondant à un intervalle de 12,5 ns entre deux impulsions, semble bien appropriée à la plupart des molécules en solution dont la durée de vie de fluorescence est généralement inférieure à quelques nanosecondes.

La valeur du seuil de puissance moyenne avant saturation, d'environ 50 mW (flux de photons incident de 10^{30} - 10^{31} photons $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), a été confirmée pour une large gamme de fluorophores lors d'études ultérieures [Albota 1998, Xu 1996]. Notons que les puissances employées expérimentalement pour la plupart des applications biologiques sont en général largement inférieures à ce seuil.

Effets thermiques.

Il a été démontré que pour des impulsions peu énergétiques à haute cadence (impulsions de 100 fs, 80 MHz, puissance moyenne 100 mW $\Rightarrow$ ~ 1 nJ/impulsions) comparées à une excitation continue avec la même puissance moyenne, les effets thermiques générés sont généralement négligeables [Denk 1995]. Nous rappellerons que l'excitation biphotonique de la fluorescence peut s'effectuer en régime continu. Les puissances moyennes mises en jeu sont alors supérieures à celles utilisées en régime femtoseconde d'un facteur 10^2 à 10^3 , et sont donc inadaptées pour la plupart des applications. On constate donc ici l'importance de l'utilisation de lasers à impulsions femtosecondes pour la survie du matériel biologique. Certaines précautions doivent néanmoins être prises dans les cas où la concentration locale de fluorophores est très élevée.

Photo-blanchiment.

Comme dans le cas des effets de saturation, les effets de photo-blanchiment dépendent des sections efficaces d'absorption, de la densité de puissance incidente mais aussi des affinités réactionnelles des fluorophores avec les molécules environnantes. Ces effets sont donc difficiles à quantifier. Il apparaît qu'à faible intensité d'excitation, les taux de photo-blanchiment, suite à une excitation monophotonique et biphotonique, sont comparables mais ce taux peut être considérablement augmenté dans le cas biphotonique lors de l'utilisation de puissances élevées [Patterson 2000]. Néanmoins, considérant que les densités de puissances employées lors des études en milieu biologique vivant sont extrêmement faibles, les effets de photo-blanchiment sont généralement minimisés. Nous insisterons aussi sur le fait que le microscope confocal de fluorescence induit des effets de photo-blanchiment sur la quasi-totalité du trajet du faisceau. Une dégradation progressive de l'échantillon lors d'acquisitions dans des plans focaux successifs est ainsi induite pouvant dégrader la qualité et la fiabilité des informations obtenues. Dans le cas du microscope biphotonique, cet effet est restreint au micro-volume de focalisation. Il a été estimé que, pour des conditions d'excitation comparables, le nombre moyen de fluorophores dégradés dans un échantillon lors d'une série d'acquisition d'images de 10 sections en profondeur par microscopie confocale était environ

égal au nombre total de fluorophores dégradés pour 100 sections en microscopie biphotonique. Ceci aura évidemment un impact considérable pour la survie des échantillons biologiques.

Viabilité des échantillons biologiques sous excitation à deux photons.

La viabilité des échantillons biologiques est la contrainte la plus importante en microscopie de fluorescence. Bien que dans le cas de la microscopie biphotonique, une réduction importante des dommages induits est attendue, il faut garder à l'esprit que les effets engendrés dans le plan focal, sous certaines conditions, sont comparables à ceux consécutifs à une excitation monophotonique. En particulier, les effets dus à des réactions à l'état excité du fluorophore, avec la possibilité de génération de photo-produits toxiques, persistent. De plus, étant donné le manque de données concernant le processus d'absorption à deux photons, la possibilité de sections efficaces d'absorption à deux photons importantes pour certains fluorophores endogènes ne peut être exclue. Ces composants cellulaires seraient alors particulièrement susceptibles d'être endommagés.

Les photo-dommages générés en milieu cellulaires par une EDP sont difficiles à prévoir. Bien que certaines publications montrent que la viabilité des cellules peut être significativement compromise dans le cas d'une EDP [Schwille 1999, Risdale 1993], la plupart des études révèle un avantage certain pour ce mode d'excitation.

Nous citerons ici quelques exemples :

- Denk *et al.*, lors de la première expérience de microscopie par EDP en cellules vivantes (1990) constatèrent que l'exposition des cellules, contenant de l'ADN marqué, pendant quelques minutes à une radiation UV provenant d'une lampe à vapeur de mercure, produisait des changements morphologiques sévères. À l'inverse, suite à une EDP dans des conditions de puissances similaires, aucun changement morphologique n'était visible,
- l'étude de myocytes cardiaques marqués à l'Indo1 (marqueur du calcium) pour une application d'imagerie de l'activité calcique [Piston 1994], montra que les cellules survivaient plus longtemps dans le cas d'une excitation biphotonique produisant le même taux de fluorescence au plan focal que celui généré lors d'une excitation monophotonique.

Dans tous les cas, les dommages induits par une excitation biphotonique sont proportionnels au nombre de photons absorbés donc ils dépendent du carré du flux de photons incidents sur l'échantillon. Les puissances moyennes doivent ainsi être suffisamment faibles pour minimiser les éventuelles dégradations.

Toutes ces constatations réunies, la microscopie de fluorescence par EDP est une technique particulièrement bien appropriée et peu destructive pour les études *in-vivo*. En résumé, comparé au microscope confocal, la technique est caractérisée par une très grande simplicité de mise en œuvre, des possibilités de pénétration en profondeur dans des échantillons épais et diffusants et, sous certaines conditions d'excitation, une minimisation des photo-dommages. Depuis quelques années, cette nouvelle technique est fréquemment utilisée dans les expériences d'imagerie de fluorescence en milieu biologique vivant.

I.3. Techniques d'imagerie en microscopie de fluorescence.

Nous effectuerons ici une comparaison des différentes techniques d'imagerie existantes adaptées à la microscopie confocale ou à la microscopie biphotonique en terme de rapidité d'acquisition des images. La vitesse d'acquisition d'images est un paramètre important pour l'étude d'échantillons biologiques vivants : en effet, beaucoup de paramètres internes de la cellule tels que le potentiel membranaire, les concentrations calciques, etc., varient dans des échelles de temps allant de la milliseconde à la seconde. L'étude de ces signaux nécessite donc des acquisitions les plus rapides possibles. Par ailleurs, la limitation des effets de dégradation implique un temps d'irradiation des échantillons le plus court possible. En ce sens, les techniques d'acquisition d'images en microscopie de fluorescence tentent de se développer de plus en plus afin d'atteindre des vitesses proches de la cadence vidéo (typiquement 25-30 images/s). Nous évoquerons ici les techniques les plus courantes.

Utilisation d'une platine de translation.

La première possibilité d'imagerie en microscopie confocale est l'utilisation de platines de translation à micro-déplacements utilisant des moteurs pas à pas. Le système optique d'excitation est alors fixe, et pour chaque déplacement de l'échantillon par la platine, la fluorescence générée est collectée généralement par un photomultiplicateur. L'image est ensuite reconstruite point par point. Cette technique a l'avantage d'être très facile à mettre en œuvre. De plus, les platines de translation offrent des possibilités de déplacements fins et précis (pas de translation minimal de 100 nm environ). Cependant, certains problèmes peuvent se poser comme le mouvement des échantillons suite aux déplacements de la platine. Par ailleurs, cette méthode d'imagerie, bien que très précise, est relativement lente et le temps d'acquisition d'une image en deux dimensions (suivant la taille de l'image voulue, les pas de

translation utilisés et l'efficacité de détection) varie typiquement de quelques dizaines de secondes à plusieurs minutes.

Imagerie par balayage laser.

La technique la plus couramment utilisée pour l'acquisition d'images d'intensité de fluorescence en microscopie confocale ou biphotonique est le balayage laser de l'échantillon au moyen de miroirs galvanométriques. Le système est basé sur l'utilisation de deux miroirs perpendiculaires entre eux dont la rotation induit une déviation dans le trajet du faisceau laser incident. En contrôlant l'angle de déflexion de ces deux miroirs, l'angle d'incidence sur l'objectif de microscope varie et le point de focalisation dans l'échantillon se déplace progressivement, permettant un balayage de la zone d'intérêt. Ces systèmes sont caractérisés par des possibilités de rotations rapides (de 500 Hz à quelques kHz) et des angles de déflexion minimaux très faibles (quelques μrad), permettant l'acquisition rapide d'images sans pertes de résolution spatiale. La taille des images et la durée des acquisitions est par ailleurs définie par l'utilisateur par le contrôle de l'angle de déflexion maximal à appliquer et de la vitesse de balayage. Finalement, la durée d'acquisition d'une image par balayage laser est typiquement de quelques secondes.

Pour fixer les idées, nous indiquons ici les caractéristiques de plusieurs systèmes commerciaux disponibles basés sur cette technique [Bliton 1995]:

- BioRad MRC-1000 : durée d'acquisition pour une image de 768 x 512 pixels : ~ 1 s,
- Carl Zeiss LSM 410 : durée d'acquisition pour une image de 512 x 512 pixels : 0,7 s,
- Olympus LSM-GB200 : durée d'acquisition pour une image de 640 x 480 pixels : ~ 1 s.

Notons que le microscope confocal de fluorescence à balayage laser requiert une configuration optique spécifique et un alignement précis en raison de l'utilisation du trou de filtrage à la détection. Ces difficultés sont partiellement éliminées dans le cas du microscope biphotonique.

Imagerie de fluorescence par balayage sur le principe du disque de Nipkow.

L'utilisation d'un disque de Nipkow en microscopie confocale fut démontrée dès 1968 [Petran 1968] permettant l'acquisition d'images en temps réel. La technique (figure I.3.1) est un mode d'imagerie multipoints basée sur l'utilisation d'un disque composé d'une multitude de trous disposés de manière hélicoïdale [Kino 1995].

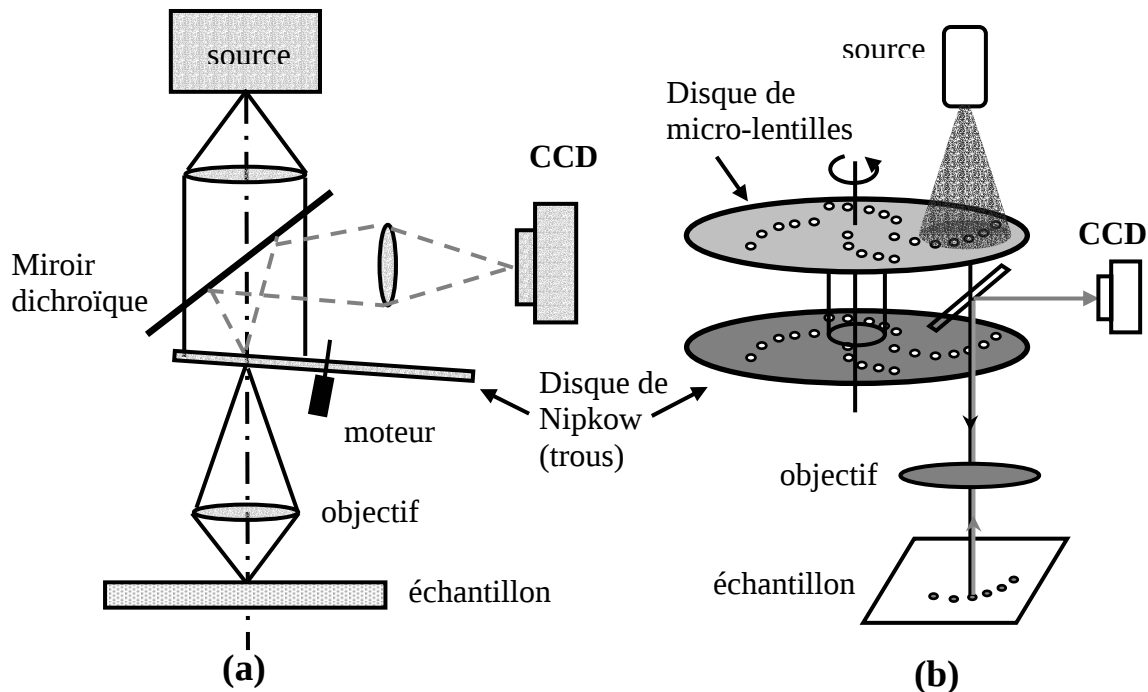


Figure I.3.1 : principe du microscope confocal à balayage utilisant un disque de Nipkow (a), ou associant ce disque avec une matrice de micro-lentilles (b).

Le faisceau de lumière incident sur le disque est divisé en autant de faisceaux qu'il y a de trous illuminés définissant ainsi plusieurs points d'excitation dans l'échantillon. Ce disque de trous est disposé de manière à diviser le faisceau incident à l'excitation mais aussi à filtrer la lumière émise à la détection. Par rotation rapide de ce disque (typiquement 2000 tours/mn), l'échantillon est balayé sur toute sa surface permettant l'acquisition extrêmement rapide d'images qui peuvent être visualisées directement à l'œil (par les oculaires du microscope) ou grâce à une caméra CCD (qui fonctionne à une cadence suffisamment faible pour permettre la visualisation d'une image complète). Cette configuration simple basée sur l'utilisation d'un seul disque troué, bien que très performante en terme de rapidité de balayage est cependant limitée. Le système est en effet caractérisé par une très faible efficacité d'excitation en raison des pertes très importantes introduites par le disque de trous. Pour palier à ce problème, il est possible d'utiliser une combinaison d'un disque de micro-lentilles et d'un disque de Nipkow perforé comme illustré sur la figure I.3.1(b). Les deux disques sont parfaitement alignés et leur rotation s'effectue de manière synchrone. Par rapport à l'utilisation d'un disque de trous seul, l'efficacité d'excitation est augmentée grâce au disque de lentilles. Le disque de Nipkow sert ici plus particulièrement de filtrage à la détection.

Ce type de système est commercialisé par la plupart des sociétés productrices de microscopes (Carl Zeiss, Nikon, ...) avec l'avantage d'obtenir un instrument permettant l'acquisition

d'images à hautes résolutions spatiales pour un coût raisonnable. Typiquement, les disques sont composés de 200 000 trous d'environ 25 μm de diamètre. À condition que l'intensité de la lumière émise soit suffisante, une rotation du disque à environ 2000 tours par minute autorise des acquisitions à une cadence largement supérieure à la cadence vidéo (pouvant aller jusqu'à plus de 500 images/s) avec des résolutions spatiales tridimensionnelles comparables à celles obtenues avec un microscope confocal classique.

Un système similaire a par ailleurs récemment été adapté à la microscopie biphotonique [Straub 1998, Bewersdorf 1998]. Dans ce cas, la configuration du système est simplifiée : il suffit d'utiliser un disque de micro-lentilles conformément à la figure I.3.1-b. Le disque de Nipkow est quant à lui éliminé, car le filtrage à la détection n'est plus nécessaire. Typiquement, on utilise un laser à saphir dopé au titane émettant des impulsions femtosecondes dont la puissance moyenne est d'environ 1 W. Le faisceau incident est élargi spatialement afin de couvrir une zone suffisamment large sur le disque de micro-lentilles. D'un point de vue expérimental, les premiers résultats consécutifs à l'utilisation de ce système furent obtenus en formant simultanément environ 25 faisceaux de puissance moyenne 1-10 mW grâce au disque de micro-lentilles, donnant, après focalisation par un objectif de microscope de grande ouverture numérique (1,4) autant de points d'excitation dans l'échantillon. Une rotation du disque à une fréquence de 75 Hz (4500 tours/mn) permet alors l'acquisition d'images par une caméra CCD à la cadence de 375 images/s en milieu biologique vivant.

Les techniques d'imagerie de la fluorescence en microscopie confocale ou biphotonique de fluorescence sont de plus en plus employées pour l'étude d'échantillons biologiques vivants permettant l'obtention d'informations sur l'arrangement spatial des constituants cellulaires ou la localisation de sondes fluorescentes. Ces deux types de microscopies de fluorescence sont par ailleurs, depuis quelques temps, combinés à des techniques d'analyse dynamique récentes de l'émission de fluorescence, permettant d'obtenir des informations essentielles sur l'environnement et les propriétés moléculaires des composants cellulaires [So 1998]. L'association des techniques d'imagerie et des méthodes d'analyse résolues en temps permet alors de corréliser les propriétés réactionnelles des complexes étudiés avec des informations topologiques. Dans ce contexte, en raison de ses divers avantages, la microscopie biphotonique devient une technique puissante et très bien adaptée à des études *in-vivo* mais qui est encore à ce jour très peu utilisée. C'est donc cette voie que nous avons exploitée dans le cadre de notre projet avec le développement de deux

techniques d'analyse dynamique de la fluorescence : la microscopie de corrélation de fluorescence et l'imagerie de durée de vie de fluorescence dont on exposera les principes généraux dans les deux paragraphes suivants.

I.4. La microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons.

Nous présenterons dans ce paragraphe une première méthode d'analyse de la dynamique d'émission de la fluorescence que nous avons adaptée à notre microscope biphotonique: la microscopie de corrélation de fluorescence (MCF).

Après une brève définition de cette technique, qui permet la détermination de coefficients de diffusion moléculaire, nous présenterons son principe général et son domaine d'applications. Afin de montrer ses avantages, nous terminerons ce paragraphe par une comparaison de la MCF avec d'autres méthodes utilisées pour la mesure de coefficients de diffusion.

I.4.1. La microscopie de corrélation de fluorescence : définition.

La spectroscopie de corrélation de fluorescence a été proposée comme une méthode d'analyse de processus dynamiques il y a environ 30 ans [Elson 1974, Ehrenberg 1974, Aragon 1976]. Le principe de la technique est basé sur la mesure des fluctuations temporelles de l'intensité de fluorescence émise par un petit nombre de molécules présentes dans un petit volume d'excitation. Par analyse de ces fluctuations, il est possible d'obtenir des informations sur les processus dynamiques qui les produisent. Ces processus sont typiquement la diffusion des molécules, des processus photochimiques ou photophysiques amenant les molécules dans un état non fluorescent tels que la formation d'états triplet ou les transferts de protons. La spectroscopie de corrélation de fluorescence permet ainsi la détermination des coefficients de diffusions moléculaires et des constantes de temps caractéristiques de diverses réactions à l'état excité des molécules avec leur environnement. La technique fut cependant très peu utilisée expérimentalement au cours des vingt dernières années en raison de certaines difficultés liées à la nécessité du confinement de l'excitation en un très petit volume et de l'utilisation de concentrations moléculaires très faibles obligeant l'emploi de détecteurs ultra sensibles. Ces divers problèmes ont été récemment résolus grâce au développement des appareils de détections (photomultiplicateurs, photodiodes à avalanche) et des progrès en microscopie de fluorescence. Grâce à la microscopie confocale ou biphotonique, il est désormais possible de définir des volumes d'excitation de quelques femtolitres ($1 \text{ fl} = 10^{-15} \text{ l}$)

ou $1 \mu\text{m}^3$). L'association de la spectroscopie de corrélation de fluorescence et de ces techniques de microscopie porte le nom de microscopie de corrélation de fluorescence (MCF) [Brock 1998].

L'utilisation de l'excitation à deux photons (EDP) pour la MCF présentent par ailleurs certains avantages comparée à la configuration confocale en raison des diverses propriétés exposées au paragraphe I.2. En résumé, le confinement intrinsèque de l'excitation permet une détection exclusive de la fluorescence émise avec un bruit de fond extrêmement faible, offrant des possibilités de **détection d'une molécule unique** [Mertz 1995, Brand 1997]. La limitation des dommages induits sous excitation à deux photons est aussi un paramètre primordial pour les applications de la MCF en milieu biologique vivant [Berland 1995].

I.4.2. Principe de la microscopie de corrélation de fluorescence et détermination des constantes de diffusion.

Le principe de fonctionnement de la technique de MCF est relativement simple : il suffit d'enregistrer l'intensité de fluorescence émise par le volume sondé en fonction du temps. D'un point de vue expérimental, il s'agira de mesurer l'intensité de fluorescence $I_F(t)$ émise en fonction du temps, c'est-à-dire de compter le nombre de photons de fluorescence émis dans un intervalle de temps de durée T_p et de réaliser ce comptage sur un nombre significatif N_c d'intervalles. On obtient ainsi, comme l'illustre la figure I.4.1, une courbe reflétant les fluctuations temporelles de l'intensité de fluorescence.

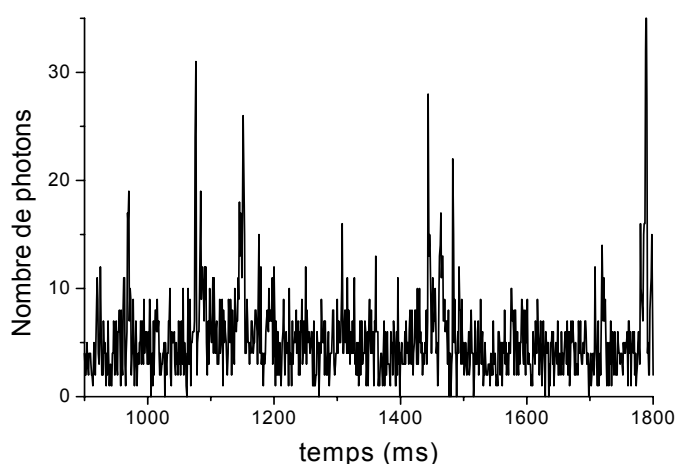


Figure I.4.1 : allure typique des fluctuations de l'intensité de fluorescence au cours du temps (courbe réalisée grâce à des billes de latex fluorescentes de rayon 13 nm (Molecular Probes) en suspension dans l'eau, $T_p = 0,3 \text{ ms}$).

L'analyse de ces fluctuations s'effectue ensuite par calcul de l'autocorrélation mathématique normalisée de ce signal de fluorescence :

$$g(\tau) = \frac{\langle I_F(t)I_F(t+\tau) \rangle}{\langle I_F^2(t) \rangle} = \frac{\int I_F(t)I_F(t+\tau) dt}{\int I_F^2(t) dt}. \quad (I.4.1)$$

En considérant que l'intensité de fluorescence fluctue autour d'une valeur moyenne : $I_F(t) = \langle I_F \rangle + \delta I_F(t)$, l'autocorrélation des fluctuations de fluorescence peut se mettre sous la forme suivante :

$$g(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I_F(t)\delta I_F(t+\tau) \rangle}{\langle I_F^2 \rangle}. \quad (I.4.2)$$

Considérons le cas simple où seules les fluctuations temporelles de la concentration moléculaire à l'intérieur du volume d'excitation conduisent à des fluctuations d'intensité de fluorescence. Dans le cas d'une excitation à deux photons, on a :

$$\delta I_F(t) = \int \delta I_F(r, t) dr \propto \int \delta C(r, t) I_E^2(r) dr, \quad (I.4.3)$$

où $I_E(r)$ et $C(r, t)$ sont respectivement l'intensité de l'onde excitatrice et la concentration des molécules fluorescentes au point de coordonnées $r(x, y, z)$ et au temps t .

Pour un système gouverné par une diffusion Brownienne, la relation entre le coefficient de diffusion translationnelle D_t et les fluctuations de la concentration est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = D_t \nabla^2 C(r, t). \quad (I.4.4)$$

Dans le cas d'une diffusion translationnelle dans les trois dimensions de l'espace, suite à la résolution de l'équation différentielle ci-dessus, il a été démontré que [Elson 1974, So 1998]:

$$\langle \partial C(r, t) \partial C(r', t + \tau) \rangle = \langle C \rangle (4\pi D_t \tau)^{-3/2} \exp\left(\frac{-|r - r'|^2}{4D_t \tau}\right). \quad (I.4.5)$$

$\langle \delta I_F(t) \delta I_F(t + \tau) \rangle$ et $\langle \partial C(r, t) \partial C(r', t + \tau) \rangle$ sont alors reliées entre elles par l'équation suivante :

$$\langle \delta I_F(t) \delta I_F(t + \tau) \rangle = \alpha^2 \int dr \int dr' I_E^2(r, t) I_E^2(r', t) \langle \partial C(r, t) \partial C(r', t + \tau) \rangle. \quad (I.4.6)$$

Considérons alors un profil spatial tridimensionnel gaussien de la répartition de l'intensité des impulsions laser excitatrices :

$$I_E(r) = I_{E0} \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{z_0^2}\right), \quad (I.4.7)$$

où ω_0 et z_0 sont respectivement le rayon de col du faisceau et la profondeur de focalisation au foyer de l'objectif utilisé. Ces deux paramètres sont donc représentatifs des dimensions du volume d'excitation défini par le laser.

Après calcul, la fonction d'autocorrélation I.4.2 devient [Chen 2001]:

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\sqrt{8N}} \left(1 + \frac{8D_t\tau}{\omega_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{8D_t\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2}. \quad (I.4.8)$$

Cette fonction peut encore s'écrire sous la forme suivante [Brand 1997]:

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\sqrt{8N}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2}, \quad (I.4.9)$$

où τ_D est le temps de diffusion translationnelle, c'est-à-dire le temps moyen mis par une molécule pour traverser latéralement le volume d'excitation, et N le nombre moyen de molécules contenues dans le volume d'excitation. Dans le cas d'une excitation biphotonique, le temps de diffusion est défini par : $\tau_D = \omega_0^2 / 8D_t$.

Ainsi, par l'ajustement de cette fonction théorique avec les points expérimentaux, il est possible d'obtenir deux caractéristiques importantes du système moléculaire étudié : sa concentration, par l'intermédiaire de N , et le coefficient de diffusion des molécules. Par ailleurs, notons que l'amplitude initiale des courbes de corrélation est inversement proportionnelle à N d'où la nécessité de travailler sur un nombre de molécules réduit. Généralement, les concentrations moléculaires utilisées pour des mesures de corrélation de fluorescence sont de l'ordre de grandeur du nM/l.

Afin d'illustrer l'influence du nombre de molécules contenues dans le volume d'excitation et du temps de diffusion, la figure I.4.2 représentent l'allure typique de courbes de corrélation théoriques correspondant à un système contenant une seule espèce de molécules soumises à un processus de diffusion uniquement (relation I.4.9).

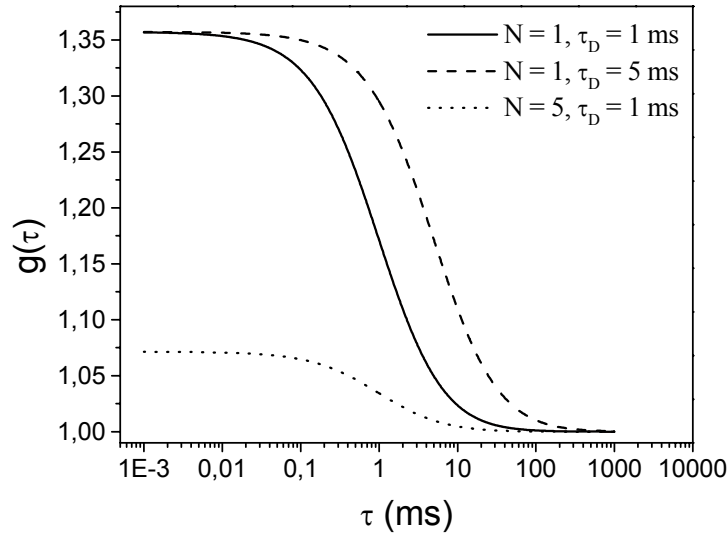


Figure I.4.2 : courbes de corrélation de fluorescence théoriques correspondant à un système soumis à un processus de diffusion uniquement pour plusieurs valeurs de N et de τ_D .

Nous noterons qu'en cas de besoin, ce modèle peut être modifié pour l'étude de systèmes contenant plusieurs espèces moléculaires différentes. La fonction de corrélation s'écrit alors sous la forme suivante :

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\sqrt{8N_{\text{tot}}}} \sum_i A_i \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{Di}} \right)^{-1/2}, \quad (\text{I.4.10})$$

où N_{tot} représente le nombre moyen de molécules, toutes espèces confondues, dans le volume d'excitation. Chaque type de molécule sera caractérisée par un temps de diffusion τ_{Di} et A_i est un facteur de poids correspondant à la contribution de chaque espèce i dans la courbe de corrélation.

Plusieurs processus autres que la diffusion peuvent également être à l'origine de fluctuations de l'intensité de la fluorescence émise par une molécule. Typiquement, ce sont des processus réversibles qui se produisent à l'état excité tels que le passage des molécules vers un état triplet ou diverses réactions physico-chimiques comme par exemple les transferts de protons. Ces processus ont pour effet de rendre les molécules momentanément non fluorescentes et sont généralement caractérisés par des durées de vie très courtes ($< 10 \mu\text{s}$) par rapport au temps de diffusion (variant typiquement de $100 \mu\text{s}$ à quelques ms selon les molécules). Ainsi, ils se manifestent dans les courbes de corrélation par une composante

rapide au début de la courbe (figure I.4.3). L'analyse de ces processus non radiatifs s'effectue donc en ajoutant un terme supplémentaire à la fonction d'autocorrélation qui s'écrit alors :

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\sqrt{8N}} \left(1 + \frac{F \exp(-\tau/\tau_r)}{1-F} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\omega_0}{Z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2} \quad (\text{I.4.11})$$

F représente ici la fraction de molécules qui sont passées dans un état non radiatif et τ_r est la durée de vie de cet état.

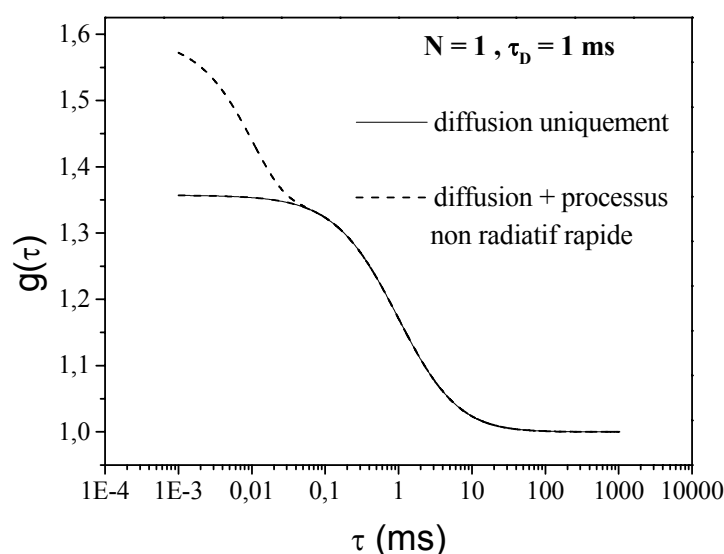


Figure I.4.3 : illustration de l'influence d'un processus non radiatif rapide sur les courbes de corrélation de fluorescence. La courbe théorique correspondant à un processus diffusionnel uniquement ($N = 1$, $\tau_D = 1$ ms) est comparée à la courbe de corrélation de fluorescence que l'on obtiendrait dans les mêmes conditions ($N = 1$, $\tau_D = 1$ ms) si un processus non radiatif (ici, $F = 0,2$ et $\tau_r = 10$ μ s) avait lieu au cours de la mesure.

I.4.3. Domaines d'application de la microscopie de corrélation de fluorescence.

La MCF est une technique puissante pour l'étude de la diffusion et de diverses réactions physico-chimiques sur de très faibles populations moléculaires. Étant données les possibilités de détection ultrasensible de la fluorescence liées au développement de détecteurs très sensibles et des techniques de microscopie, un regain d'intérêt envers cette méthode est observé depuis quelques années avec de nombreuses implications dans le domaine de la biologie. En effet, les capacités de détection d'une molécule unique ouvrent de nouvelles voies pour l'identification et l'étude de composés isolés ou pour l'analyse de processus d'interaction ou de changement de conformation d'entités telle que l'ADN, sans perturbation par les molécules environnantes. Le domaine d'application de la MCF est donc très vaste.

En microscopie confocale, la méthode a été largement appliquée à des études en solution de formation d'agrégats [Palmer 1987], de population et de durée de vie de triplets [Widengren 1995], de diffusion translationnelles [Rigler 1993] ou de diverses réactions (transferts de charges, effets de concentrations ioniques, interactions moléculaires) [Widengren 1998]. Cependant, seulement quelques applications à l'étude d'échantillons biologiques ont été à ce jour reportées [Politz 1998, Brock 1998], probablement en raison des problèmes rencontrés dans ce cas : dégradation du rapport signal à bruit à cause de la diffusion, autofluorescence des milieux biologiques, photoblanchiment rapide des fluorophores contenus dans des compartiments restreints et dommages induits à l'excitation.

Pour palier à ces problèmes, l'utilisation de l'EDP paraît une bonne alternative. Néanmoins, les applications biologiques de la MCF sous EDP sont encore peu répandues et consistent principalement en la caractérisation de la diffusion moléculaire en milieu intracellulaire (cytoplasme, membranes) [Berland 1995, Schwille 1999].

I.4.4. Comparaison avec les autres techniques de mesures des coefficients de diffusion.

Ce paragraphe présente brièvement le principe d'autres techniques utilisées pour la détermination des coefficients de diffusion translationnelle moléculaire. Nous décrirons les capacités et les limites de chacune de ces méthodes, afin de montrer les avantages de la MCF.

I.4.4.1. La diffusion quasi-élastique de la lumière.

Comme dans le cas de la MCF, la technique de diffusion quasi-élastique de la lumière appliquée à la détermination de coefficients de diffusion translationnelle est basée sur l'analyse de fluctuations enregistrées dans le signal détecté. Cette méthode consiste à mesurer l'intensité diffusée par les molécules (diffraction Rayleigh). Le principe est le suivant : suite à la diffusion translationnelle des molécules au travers du faisceau de lumière incident, la concentration moléculaire locale varie, induisant des variations d'indice de réfraction de la solution et donc des fluctuations de l'intensité diffusée. Nous n'entrerons pas ici dans le détail du processus de diffusion de la lumière, la méthode sera donc exposée simplement.

Il a été démontré que l'intensité diffusée par unité de volume par une solution de particules soumise à une telle onde s'exprimait de la manière suivante [Marshall 1978a]:

$$I_{\text{dif}} = I_0 \frac{2\pi^2 n_0^2 \psi^2}{\lambda^4 N_0} \frac{1 + \cos^2 \theta}{r^2} CM_M, \quad (\text{I.4.12})$$

avec $\psi = (n - n_0)/C$, n étant l'indice de réfraction de la solution concernée, n_0 celui du solvant et C la concentration globale de la solution. ψ représente donc ici la variation de l'indice de réfraction du milieu avec la concentration. N_0 est le nombre de particules diffusantes par mole, M_M leur masse molaire. I_0 est l'intensité de l'onde incidente et λ sa longueur d'onde. θ correspond à l'angle entre la direction d'observation de la lumière diffusée et la direction de propagation de l'onde incidente (figure I.4.4) et r représente les coordonnées du point d'observation.

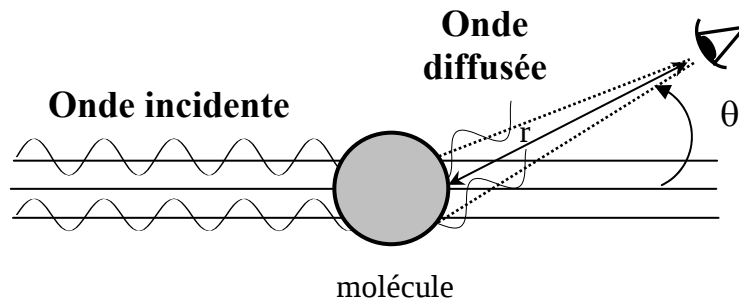


Figure I.4.4 : illustration de la diffusion d'une onde sinusoïdale par une molécule.

L'équation I.4.12 montre qu'il sera nécessaire, de manière à obtenir un signal dont l'intensité soit suffisante pour être exploitée, que la concentration soit relativement élevée. L'observation des signaux dans une direction différente de celle du faisceau incident permettra d'isoler et de ne détecter que la lumière diffusée dans cette direction.

Une fonction de corrélation $G_{\text{dif}}(\tau)$ est alors définie prenant en compte les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée :

$$G_{\text{dif}}(\tau) = \langle I_{\text{dif}}(r, t) I_{\text{dif}}(r, 0) \rangle. \quad (\text{I.4.13})$$

De manière similaire au cas de la MCF, cette fonction de corrélation peut se développer en tenant compte de la relation existante entre l'intensité de la lumière diffusée et la concentration (équation I.4.12). Les fluctuations de l'intensité diffusée seront dans ce cas dues à la variation ψ de l'indice de réfraction lors de changement de la concentration locale des particules en fonction du temps.

Après calcul, la fonction de corrélation peut s'exprimer sous la forme suivante [Marshall 1978b] :

$$G_{\text{dif}}(\tau) = G_0 \exp(-2K^2 D_t \tau) \quad \text{avec } K = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}. \quad (\text{I.4.14})$$

Il a par ailleurs été démontré que la dépendance en fréquence de l'intensité de la lumière diffusée, déterminée par la transformée de Fourier de cette fonction de corrélation, est de forme Lorentzienne dont la largeur à mi-hauteur est proportionnelle au coefficient de diffusion. Expérimentalement, la méthode consiste, comme l'illustre la figure I.4.5, à reconstituer point par point le spectre en fréquence de l'intensité diffusée.

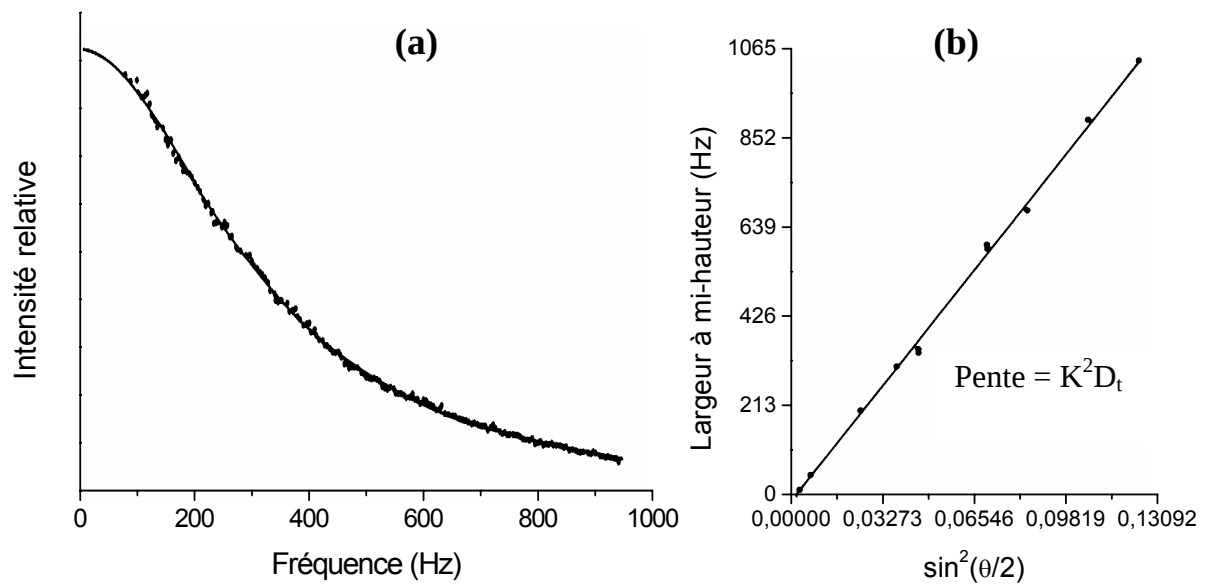


Figure I.4.5 : détermination de constantes de diffusion par la méthode de diffusion de la lumière. (a) Intensité relative diffusée en fonction de la fréquence par une solution d'hémoglobine carboxy de concentration 1 mM/l irradiée par un laser hélium-néon (angle de diffusion $\theta = 23^\circ$), (b) tracé de la largeur à mi-hauteur de ce spectre en fonction de $\sin^2(\theta/2)$ [Marshall 1978b].

En représentant ensuite la largeur à mi-hauteur de ce spectre comme une fonction de $\sin^2(\theta/2)$, on obtient une droite dont la pente est directement proportionnelle au coefficient de diffusion. Une autre méthode expérimentale, similaire à celle employée en MCF, est basée sur le calcul direct de la fonction de corrélation à partir de l'enregistrement de l'intensité diffusée en fonction du temps.

On utilise typiquement pour ces mesures de diffusion de la lumière des sources laser hélium-néon. Les concentrations moléculaires des particules ou molécules étudiées sont quant à elles de l'ordre de grandeur de la mM/l. Ainsi, comparée à la technique de MCF, la méthode de la

diffusion de la lumière requiert des concentrations élevées. Il n'est plus question ici d'atteindre la détection d'une molécule unique. Par ailleurs, cette méthode est limitée à l'étude de grosses particules (billes de latex) ou de macromolécules (Dextran, ADN, protéines, virus, bactéries), l'intensité de la lumière diffusée n'étant pas suffisante pour être détectable dans les autres cas. Enfin, son domaine d'application est restreint à l'étude de molécules en solution.

Disposant d'un tel système de mesure des coefficients de diffusion (montage réalisé par Bernard Arrio), nous l'utiliserons afin de nous assurer de la validité de nos résultats obtenus par MCF.

1.4.4.2. Méthode des chambres de diffusion.

La mesure des coefficients de diffusion grâce aux chambres de diffusion est la méthode la plus simple dans son principe. Elle repose sur un système de deux compartiments séparés par une membrane perméable (figure I.4.6) d'épaisseur connue. Les deux compartiments sont initialement remplis de solvant de manière à se placer dans des conditions d'équilibre.

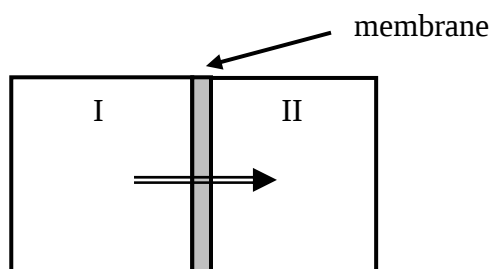


Figure I.4.6 : principe des chambres de diffusion.

Après l'introduction d'une espèce moléculaire dans l'un des compartiments, l'intensité de fluorescence globale émise par la population moléculaire contenue dans chacun des compartiments est mesurée en fonction du temps par spectrofluorimétrie.

En spectroscopie d'absorption monophotonique, les variations de l'intensité de fluorescence sont directement proportionnelles aux variations de concentrations. Pour un système gouverné par un processus de diffusion, les variations de concentration en un point r de coordonnées (x,y,z) en fonction du temps obéissant à la loi I.4.4, le coefficient de diffusion moyen D_t peut être déterminé par la formule suivante :

$$C(r, t) = C_0 \left(\frac{1}{4\pi D_t t} \right)^{-3/2} \exp \left(-\frac{r^2}{4D_t t} \right), \quad (\text{I.4.15})$$

où $C(r, t)$ et C_0 sont respectivement la concentration au point de coordonnées $r(x, y, z)$ et au temps t et la concentration initiale.

Comme dans le cas de la diffusion de la lumière, la technique requiert des concentrations initiales relativement élevées (de l'ordre de la mM/l). Cependant, l'utilisation de molécules de petite taille est ici possible. Cette méthode est surtout applicable à des études en solution. Nous citerons tout de même ici une application de la technique des chambres de diffusion pour l'étude de biofilms de bactéries [Bryers 1998]. Pour cette étude, la culture des biofilms s'effectua directement sur la membrane perméable des chambres de diffusion. Les possibilités de diffusion des fluorophores à travers les biofilms furent ainsi analysées pour des molécules de différentes tailles. Notons que la technique est alors assez contraignante : pour chaque mesure de concentration en fonction du temps, il est nécessaire de transvaser la solution contenue dans chacun des compartiments dans les cuves appropriées au spectrofluorimètre. De plus, les coefficients de diffusion déterminés sont obtenus de manière indirecte puisque les mesures ne sont pas effectuées à l'intérieur de l'échantillon et ne tiennent pas compte des différents processus se produisant à l'intérieur du biofilm (adsorptions ou interactions des molécules avec les bactéries, blocage des molécules à l'intérieur du biofilm ou processus de diffusion transverses). Les coefficients de diffusion sont donc ici uniquement des valeurs moyennes.

La méthode de détermination de coefficients de diffusion par cette technique est ainsi extrêmement limitée en ce qui concerne les applications en milieu biologique. Il est évident qu'elle ne peut, par exemple, être appliquée au milieu cellulaire.

1.4.4.3. Méthode de retour de la fluorescence après photo-blanchiment.

Cette méthode, plus connue sous le nom de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) est une technique simple basée sur la microscopie de fluorescence [Axelrod 1976]. Un petit élément de volume, typiquement le volume focal défini par un objectif de microscope, contenant des molécules fluorescentes est soumis à une excitation par une impulsion lumineuse très intense de manière à éteindre la fluorescence c'est-à-dire détruire les fluorophores présents dans ce volume. Le taux de retour de la fluorescence, qui s'effectue en raison de la diffusion, par l'entrée des molécules environnantes qui n'ont pas été irradiées

à l'intérieur du volume, est ensuite mesuré permettant la détermination des coefficients de diffusion. D'un point de vue expérimental, la méthode consiste à mesurer, après le photo-blanchiment du volume focal, l'intensité de fluorescence émise par ce volume en fonction du temps. Dans le cas d'une absorption à un photon, la variation de l'intensité de fluorescence émise suit alors une loi de la forme :

$$\frac{I_F(t)}{I_0} = R_f f(t) + (1 - R_f), \quad (\text{I.4.16})$$

où $I_F(t)$ représente l'intensité de fluorescence mesurée au temps t , I_0 est l'intensité de fluorescence initiale, c'est-à-dire avant photo-blanchiment et où R_f et $f(t)$ sont définis de la manière suivante :

$$R_f = \frac{[I_F(t = \infty) - I_F(t = 0)]}{[I_0 - I_F(t = 0)]} \text{ et } f(t) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-t)^n}{n!} \frac{1}{[1 + n(1 + 2t/\tau_d)]}, \quad (\text{I.4.17})$$

avec τ une constante caractéristique de la molécule fluorescente utilisée (constante de photo-blanchiment), et τ_d le temps de diffusion défini de la même manière qu'en MCF par $\tau_d = \omega_0^2/4D_t$ dans le cas d'une excitation monophotonique ou $\tau_d = \omega_0^2/8D_t$ pour une excitation à deux photons.

La valeur du coefficient de diffusion translationnelle est donc obtenu par ajustement des paramètres τ et τ_d de l'équation I.4.17.

La technique de FRAP peut être utilisée pour des études de diffusion de molécules en solution mais elle est aussi applicable aux milieux biologiques. De plus, comparée aux deux autres méthodes présentées précédemment, elle a l'avantage de n'utiliser qu'un volume de petites dimensions. Ainsi, il est possible d'effectuer des mesures en différents points d'un même échantillon et d'obtenir de cette manière des informations sur la diffusion en fonction de différentes structures locales de l'échantillon. La technique a entre autre été appliquée à l'étude des processus diffusionnels au sein de biofilms de bactéries [Bryers 1998] ou en milieu cellulaire [Arrio-Dupont 1996].

Cependant, les mesures des coefficients de diffusion sont indirectes car l'information ne provient pas du point sondé mais est obtenue à partir des molécules qui sont initialement présentes dans la région avoisinante de ce point. Ainsi, les coefficients de diffusion obtenus demeurent des valeurs moyennes et il est difficile d'interpréter les causes et les effets des éventuelles perturbations du processus de diffusion.

Du point de vue des concentrations utilisées, elles sont plus faibles que celles requises pour les méthodes de diffusion de la lumière et des chambres de diffusion (de l'ordre de la $\mu\text{M/l}$) mais restent néanmoins supérieures d'un facteur 10^3 à celles utilisées en MCF. Par ailleurs, la technique présente quelques inconvénients : l'utilisation de très fortes densités de puissance dans le but de photo-blanchir le volume de mesure conduit inévitablement à une dégradation de l'échantillon. Par ailleurs, les mesures reposent sur le fait que les molécules subissent un processus de photo-blanchiment irréversible, ce qui n'est peut-être pas le cas pour la totalité des molécules. Lors d'un processus réversible, il se peut que des molécules initialement présentes dans le volume d'excitation participent au retour de la fluorescence observé, faussant ainsi les résultats obtenus.

Considérant ces trois techniques de mesures des coefficients de diffusion, la MCF offre des avantages certains. Tout d'abord, cette technique est utilisable en solution ou en milieu biologique vivant. De plus, en raison des très faibles concentrations moléculaires requises (quelques nM/l), elle permet des mesures sans risque de perturbations des propriétés physico-chimiques du milieu concerné. Grâce aux performances des systèmes de détection disponibles aujourd'hui, les puissances d'excitation utilisées pour l'obtention d'un signal de fluorescence suffisant sont raisonnables et en dessous des seuils de dommage de la plupart des composants cellulaires. Par ailleurs, alliée aux techniques de microscopie biphotonique, la MCF devient une méthode d'analyse non destructrice et très bien adaptée aux études *in-vivo*.

I.5. Analyse et imagerie des durées de vie de fluorescence en microscopie biphotonique.

Nous présenterons dans ce paragraphe la deuxième méthode d'analyse dynamique de la fluorescence que nous avons adaptée à notre microscope biphotonique : l'imagerie des durées de vie de fluorescence.

Nous expliquerons tout d'abord l'intérêt de cette méthode au travers des informations que procure la durée de vie de fluorescence d'une molécule. Nous exposerons également les différentes méthodes utilisées pour la mesure et l'imagerie des durées de vie de fluorescence ainsi que les domaines d'applications de ces techniques.

I.5.1 Intérêts de l'imagerie des durées de vie de fluorescence.

La durée de vie de fluorescence τ_F d'une molécule est définie comme la durée de vie de son état excité S_1 et englobe la durée de vie radiative (émission de fluorescence) et les

durées de vie des processus de désactivation non radiatifs (paragraphe I.1.1.3). Généralement, les durées de vie des processus non radiatifs sont dépendantes de l'environnement direct de la molécule et donc de la présence de ses molécules voisines. Par exemple, une variation de pH, de viscosité, de concentration ionique du solvant, ou une interaction avec une autre espèce moléculaire sera généralement accompagnée d'une variation de la durée de vie τ_F . Les techniques de mesure et d'analyse de durée de vie de fluorescence (appelées aussi technique de mesures de fluorescence résolues en temps) sont alors des moyens puissants et très sensibles pour sonder l'environnement d'un fluorophore.

Comparée aux techniques de spectroscopie ou de microscopie de fluorescence stationnaires, basées sur des mesures d'intensité ou de spectres de fluorescence, la mesure de temps de vie de fluorescence permet d'obtenir des résultats mieux contrastés. En effet, le temps de vie de fluorescence est indépendant de la concentration de fluorophores. D'autre part, chaque molécule étant caractérisée par une durée de vie qui lui est propre (sous certaines conditions de pH, de température, de viscosité, etc), il est possible, lors de mesures *in vivo*, de distinguer facilement l'émission de fluorescence d'un fluorophore spécifique de l'autofluorescence du milieu. L'identification de plusieurs espèces moléculaires fluorescentes de longueurs d'onde d'émission proches, donc difficilement différenciables de part leur spectre de fluorescence, sera également plus aisée. De plus, les durées de vie de fluorescence sont indépendantes des conditions expérimentales utilisées telles que la puissance d'excitation.

Les techniques de mesure de durées de vie de fluorescence sont de plus en plus plébiscitées dans le domaine de la microscopie confocale ou biphotonique de fluorescence pour l'étude d'échantillons biologiques. En effet, l'étude des propriétés fonctionnelles d'entités biologiques est primordiale pour la compréhension du métabolisme cellulaire. L'imagerie d'intensité de fluorescence permet cependant difficilement d'accéder à ce type d'informations. En effet, des mesures précises et quantitatives nécessitent la détermination des concentrations locales de molécules fluorescentes dans le volume sondé. De plus, la présence de multiples fluorophores (fluorophores endogènes) combinée à l'hétérogénéité des milieux biologiques et aux problèmes de diffusion, rendent impossible toute mesure quantitative par simple imagerie de l'intensité de la fluorescence émise. L'imagerie de durée de vie de fluorescence devient alors une technique complémentaire à l'imagerie d'intensité de fluorescence et permet de corréler des informations de structure et de localisation avec des propriétés dynamiques et physico-chimiques.

I.5.2 Méthodes de mesures des durées de vie de fluorescence.

Les durées de vie de fluorescence sont généralement très courtes, typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques nanosecondes. Ainsi, les techniques de mesures de durées de vie de fluorescence ne se sont développées que très récemment à la suite de l'apparition de détecteurs ultra-rapides et très sensibles et des sources laser adaptées. Les premières mesures *in vivo* de fluorescence résolue en temps furent en effet réalisées en 1990 [Dix 1990, Keating 1990]. Ces premières études, effectuées en sondant séparément plusieurs points du milieu cellulaire, montrèrent la possibilité d'obtenir des informations essentielles (concentrations calciques et viscosité du cytoplasme). Depuis, les techniques de mesures de durées de vie de fluorescence se sont considérablement développées, en permettant en plus des mesures ponctuelles, la reconstruction d'images (codées en fausses couleurs) des durées de vie de fluorescence.

Nous décrirons dans ce paragraphe les méthodes de mesures des durées de vie les plus couramment utilisées.

I.5.2.1. Mesure de durées de vie de fluorescence par fluorimétrie de phase.

La méthode de mesure de durées de vie de fluorescence par fluorimétrie de phase utilise la réponse harmonique du système étudié. L'échantillon est excité par une onde dont l'intensité est modulée sinusoïdalement, sachant qu'une onde de modulation arbitraire peut être décomposée en plusieurs composantes sinusoïdales. Nous ne traiterons donc ici que le cas théorique d'une modulation purement sinusoïdale. Soit $I_E(t)$ l'expression de l'intensité d'excitation :

$$I_E(t) = I_{E0} + I_{E\omega} \cos(\omega t + \varphi_E), \quad (I.5.1)$$

où I_{E0} et $I_{E\omega}$ représentent respectivement l'intensité moyenne et l'amplitude de l'intensité d'excitation, $\omega = 2\pi f$ et φ_E sont respectivement la fréquence et la phase de l'onde incidente.

Nous considérerons principalement le mode d'excitation monophotonique de la fluorescence. Dans ce cas, l'intensité de la fluorescence émise est modulée à la même fréquence que l'excitation mais retardée par rapport à l'onde incidente (figure I.5.1). Soit $I_F(t)$ l'expression de l'intensité de fluorescence :

$$I_F(t) = I_{F0} + I_{F\omega} \cos(\omega t + \varphi_F) \quad (I.5.2)$$

où I_{F0} et $I_{F\omega}$ représentent respectivement l'intensité moyenne et l'amplitude de l'intensité de fluorescence, φ_F est la phase du signal de fluorescence.

L'amplitude du signal d'émission de fluorescence est plus faible que celle de l'onde excitatrice.

On définit alors un facteur de démodulation M :

$$M = \frac{I_{F\omega} / I_{F0}}{I_{E\omega} / I_{E0}}. \quad (I.5.3)$$

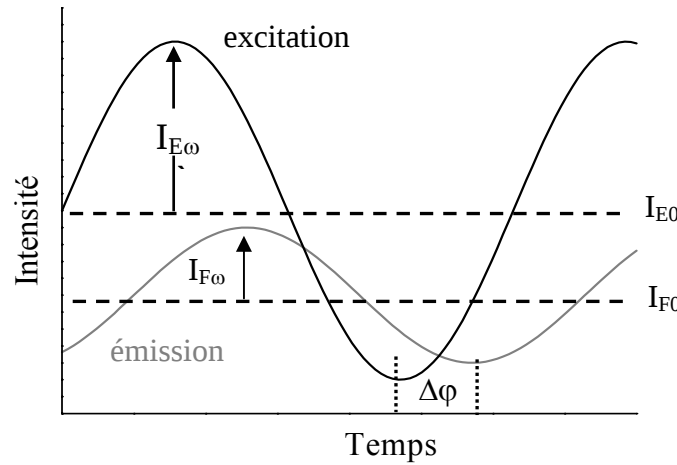


Figure 1.5.1 : Définition du retard $\Delta\varphi$ et du facteur de démodulation M .

Si l'on considère le cas simple d'un déclin de fluorescence mono-exponentiel et une seule population de fluorophores, la durée de vie de fluorescence τ_F est reliée au retard $\Delta\varphi$ entre l'onde émise et l'onde incidente ou au facteur de démodulation M selon les expressions suivantes [French 1998]:

$$\begin{aligned} \omega\tau_F &= \tan(\Delta\varphi), \\ \omega\tau_F &= \sqrt{\frac{1}{M^2} - 1}. \end{aligned} \quad (I.5.4)$$

La valeur de ω doit être de l'ordre de grandeur de l'inverse du temps de vie mesuré pour obtenir une précision maximale. Pour des durées de vie de 1 à 10 ns, les fréquences de l'onde excitatrice à utiliser sont donc typiquement de 15 à 150 MHz.

En microscopie de fluorescence par excitation monophotonique, on utilise couramment pour ce type de mesures, des sources laser continues émettant dans le visible ou le proche ultraviolet telles que les lasers à argon ionisé. La modulation en amplitude de l'intensité des ondes excitatrices s'effectue grâce à l'utilisation de modulateurs acousto-optiques ou électro-optiques, qui permettent par ailleurs d'ajuster la fréquence des ondes excitatrices en fonction des besoins (possibilités de variations de la fréquence entre 30 et 120 MHz pour les modulateurs acousto-optiques, entre 0 à 300 MHz pour les modulateurs électro-optiques) [French 1996].

Étant donnée la fréquence très élevée des ondes d'excitation et de fluorescence, la mesure précise du retard $\Delta\phi$ et du facteur M est difficile de manière directe. Des techniques de détection hétérodyne sont alors utilisées de manière à obtenir un signal de plus basse fréquence qui permettra des mesures plus aisées. Cela consiste à moduler le gain du détecteur (photomultiplicateur) à la même fréquence (détection homodyne) ou à une fréquence différente mais proche (détection hétérodyne) de celle de la source excitatrice. Pratiquement, cette modulation peut s'effectuer en modulant la tension d'alimentation du détecteur.

Pour une modulation d'amplitude sinusoïdale à la fréquence ω' , le gain du détecteur peut s'écrire sous la forme :

$$G(t) = G_0 + G_{\omega'} \cos(\omega' t + \phi_G), \quad (I.5.5)$$

où G_0 est l'amplitude moyenne du gain, $G_{\omega'}$ est l'amplitude de modulation du gain et ϕ_G sa phase.

La réponse du détecteur $S(t)$ est alors proportionnelle au signal d'intensité de fluorescence multiplié par les caractéristiques de gain du détecteur. Plus exactement, elle s'écrit de la manière suivante [Lakowicz 1983b]:

$$S(t) = G_0 I_{F0} + \frac{G_{\omega'} I_{F\omega}}{2} \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} \cos[(\omega - \omega')t + \phi_G - \phi_E + \Delta\phi]. \quad (I.5.6)$$

Comme ω et ω' sont deux fréquences relativement proches, le signal de réponse du détecteur oscille donc à une fréquence relativement faible.

Dans le cas d'une détection homodyne ($\omega = \omega'$), le signal de réponse du détecteur est directement proportionnel au cosinus du déphasage entre le signal de fluorescence et la

réponse du détecteur. Ainsi, en enregistrant le signal de réponse du détecteur pour différentes valeurs de ce déphasage, la durée de vie de fluorescence τ_F peut être déterminée.

Pour le mode de détection hétérodyne, l'acquisition s'effectue pour une valeur de déphasage fixe et en enregistrant la réponse du détecteur en fonction du temps.

Notons qu'en principe, les modes de détection homodyne et hétérodyne sont équivalents.

La technique de mesure de durées de vie de fluorescence par fluorimétrie de phase est relativement simple à implanter mais souffre de certaines limitations. En effet, nous avons considéré jusqu'à présent un déclin de fluorescence mono-exponentiel donc caractérisé par une seule durée de vie. Pratiquement, ce cas simple est rarement observé en raison de la présence de plusieurs fluorophores différents au sein des échantillons étudiés ou des éventuelles interactions physico-chimiques des fluorophores avec leur environnement. Dans ce cas, la mesure précise de durées de vie de fluorescence par la technique de fluorimétrie de phase devient problématique, notamment pour des durées de vie de valeurs très différentes.

D'autre part, la méthode est ici limitée en terme de résolution temporelle à l'étude de durées de vie de l'ordre de la nanoseconde. Des fréquences de l'ordre du gigahertz seraient en effet nécessaires pour atteindre une résolution picoseconde. Ce problème peut néanmoins être résolu par l'utilisation, pour l'excitation, de sources laser impulsionnelles (picosecondes ou femtosecondes) [Draajer 1995]. Dans ce cas, la technique est basée sur l'utilisation des fréquences harmoniques contenues dans le signal exciteur. En fonction de la largeur des impulsions émises par le laser, on peut obtenir des fréquences variant du kilohertz jusqu'à la centaine de gigahertz (pour des impulsions picosecondes) et jusqu'au terahertz (pour des impulsions femtosecondes). Une limitation provient alors des fréquences maximales de modulation des détecteurs (limitées à environ 20 GHz pour les photomultiplicateurs les plus rapides). Néanmoins, la détermination de durées de vie aussi courtes que quelques centaines de picosecondes est dans ce cas possible.

Sous un mode d'excitation par une source laser impulsionnelle femtoseconde, la technique de mesure de durées de vie de fluorescence par fluorimétrie de phase peut être adaptée à la microscopie biphotonique [So 1998, König 1996b, French 1997].

Nous noterons que la technique de mesure de durée de vie de fluorescence par fluorimétrie de phase permet des acquisitions rapides (durée d'acquisition de quelques dizaines de

microsecondes par point sondé) avec une limite de résolution temporelle typiquement de 200 ps [König 1996b, French 1996].

1.5.2.2. mesures des durées de vie de fluorescence suite à une excitation impulsionnelle.

Suite à une excitation par une impulsion ultra-brève, l'intensité de fluorescence émise par une molécule décroît exponentiellement (paragraphe I.1.1.3). La mesure de durées de vie de fluorescence dans le domaine temporel est basée sur l'enregistrement direct du déclin de l'intensité de fluorescence suite à son excitation par une impulsion ultra-brève. Considérons l'expression théorique d'un déclin de fluorescence :

$$I_F(t) = \sum_{i=1}^n A_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Fi}}\right). \quad (I.5.7)$$

où $I_F(t)$ est l'intensité de fluorescence en fonction du temps, A_i et τ_{Fi} représentent les amplitudes et durées de vie de fluorescence contenues dans le déclin.

L'analyse des données s'effectue alors par ajustement de cette fonction théorique avec le déclin expérimental et permet la détermination des durées de vie qui caractérisent le déclin et de leur amplitudes respectives.

Nous décrirons dans ce paragraphe quatre techniques utilisées pour l'acquisition de déclins de fluorescence dans le domaine temporel. Précisons que ces quatre techniques sont utilisables, sans modification de leur configuration expérimentale, pour une excitation monophotonique ou biphotonique.

Acquisitions de déclins de fluorescence par une caméra à balayage de fente.

La technique la plus simple de mesurer un déclin de fluorescence est basée sur l'utilisation de caméras à balayage de fente, caractérisées par de très bonnes résolutions temporelles (~300 fs). Grâce à ce type de détecteur, le déclin de fluorescence peut être enregistré directement suite à l'excitation de molécules par une seule impulsion laser. L'accumulation de signaux peut par ailleurs être effectuée par synchronisation de la caméra avec le train d'impulsion du laser exciteur. Le mode de fonctionnement d'une caméra à balayage de fente est représenté sur la figure I.5.2. Le signal de fluorescence est focalisé sur la fente d'entrée de la caméra. Suite à l'arrivée des photons de fluorescence, la photocathode génère instantanément (temps de réponse < 1 ps) des électrons qui sont ensuite accélérés vers

l'anode. Le nombre de photoélectrons générés est proportionnel au flux de photons instantané incident sur la photocathode. Afin de transformer le profil temporel du signal en un profil spatial, une rampe continue de tension est appliquée aux électrodes de déflexion, permettant de dévier les photoélectrons incidents proportionnellement à leur temps d'arrivée. À la sortie, les photoélectrons sont donc distribués verticalement. Ils sont ensuite détectés par une galette de microcanaux afin d'amplifier ce signal électronique, puis arrivent sur un écran phosphorescent. Le signal est finalement enregistré par une caméra CCD.

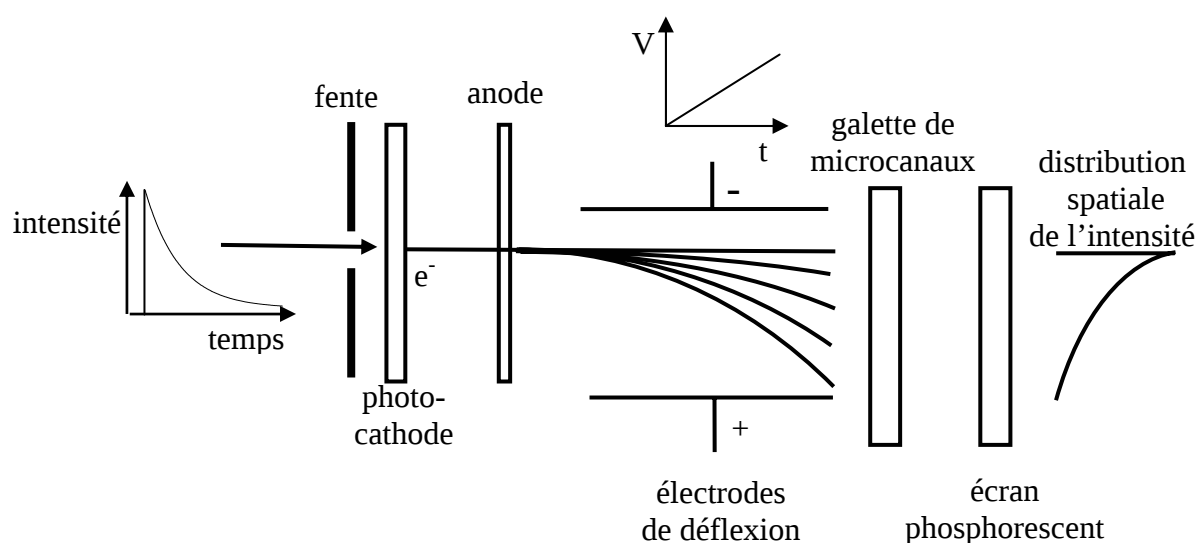


Figure I.5.2 : principe de fonctionnement d'une caméra à balayage de fente : le profil temporel du signal de fluorescence incident est transformé en une distribution spatiale d'intensité.

En raison de leur très bonne résolution temporelle et de leur sensibilité de détection (le comptage de photons uniques est possible), les caméras à balayage de fente sont bien adaptées à la mesure de signaux rapides. Néanmoins, une bonne précision des mesures dépend de la qualité de la synchronisation de la rampe de tension appliquée aux électrodes de déflexion avec le signal de fluorescence incident et requiert donc un signal de synchronisation avec très peu de dérive temporelle. L'utilisation de caméras à balayage de fente pour la mesure de durée de vie de fluorescence souffre par ailleurs d'inconvénients majeurs : la résolution temporelle du système est limitée par la résolution spatiale du détecteur. De plus, il est souvent nécessaire d'introduire certaines corrections aux déclins de fluorescence mesurés en raison de la dépendance non linéaire du gain en fonction du nombre de photons incidents.

Expérimentalement, la technique de mesure de déclins de fluorescence par l'utilisation de caméras à balayage de fente reste relativement peu exploitée (sans doute en raison des inconvénients cités ci-dessus et du coût élevé des caméras à balayage de fentes). Des

applications à l'étude de durées de vie de fluorescence en milieu biologique ont été reportées [Kusumi 1991, Lossau 1996, Glanzmann 1999].

Concernant les performances, l'utilisation de caméra à balayage de fente pour la mesure de durées de vie de fluorescence permet des acquisitions rapides : une durée d'acquisition variant de 1 à 60 secondes est généralement suffisante pour l'obtention de déclin de bonne qualité [Kusumi 1991, Lossau 1996]. Rappelons qu'en théorie, la limite de résolution temporelle est d'environ 300 fs.

Acquisition de déclin de fluorescence par la technique de spectroscopie pompe-sonde.

La spectroscopie pompe-sonde est la technique qui procure les meilleures résolutions temporelles pour les mesures de durées de vie de fluorescence [O'Connor 1984b]. Elle est basée sur l'utilisation de deux impulsions excitatrices : la première impulsion incidente (impulsion pompe), d'énergie élevée, a pour effet de saturer l'état excité singulet S_1 . L'arrivée sur l'échantillon de la deuxième impulsion (impulsion sonde) peut être retardée plus ou moins par rapport à la première impulsion au moyen d'une ligne à retard. L'intensité de fluorescence émise (suite à l'excitation par la deuxième impulsion) est alors dépendante de l'écart temporel entre les deux impulsions. En effet, plus le retard entre les impulsions pompe et sonde est grand, plus la probabilité de ré-excitation des molécules par l'impulsion sonde et donc l'intensité de fluorescence sont élevées. Le déclin temporel de l'émission de fluorescence peut ainsi être construit en faisant varier pas à pas le temps d'arrivée des deux impulsions et en enregistrant l'intensité de fluorescence en fonction de cet écart temporel.

Cette technique possède alors l'avantage de ne pas nécessiter de détecteurs ultra-rapides et les mesures s'effectuent généralement au moyen d'un simple photomultiplicateur ou d'une photodiode. D'autre part, la limite de résolution temporelle est ici définie par la durée des impulsions utilisées. Ainsi, il est possible d'accéder à des résolutions de l'ordre de la centaine de femtosecondes. Cependant, malgré ces limites de résolution temporelle plus que satisfaisantes, la technique n'est pas adaptée à l'étude de toutes les molécules. L'acquisition du déclin de fluorescence s'effectue ici point par point et l'excitation répétée des fluorophores, en plus de l'énergie très élevée des impulsions de pompe, peut conduire très rapidement à des processus de photo-blanchiment et de destruction des molécules. De plus, la variation progressive du retard entre les impulsions pompe et sonde nécessite l'emploi de systèmes de translation mécaniques et le temps d'acquisition des données pour la construction

d'un déclin sera relativement long (d'autant plus long que la durée de vie est grande). Cette technique est donc plutôt adaptée à l'étude de durées de vie très courtes (femtosecondes et picosecondes).

Bien que cette technique de pompe-sonde ne soit pas la plus couramment utilisée pour la mesure de durée de vie de fluorescence, des applications expérimentales *in vitro* ont été rapportées [Dong 1995, Buist 1997].

Acquisition de déclins de fluorescence par la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps.

La technique la plus répandue pour la mesure précise de durées de vie de fluorescence par excitation impulsionnelle est le comptage de photon unique corrélés en temps (CPUT) [O'Connor 1984a]. C'est d'ailleurs cette technique que nous utiliserons dans le cadre de cette thèse (chapitre IV).

Le principe de fonctionnement de la technique de CPUT est schématisé sur la figure I.5.3.

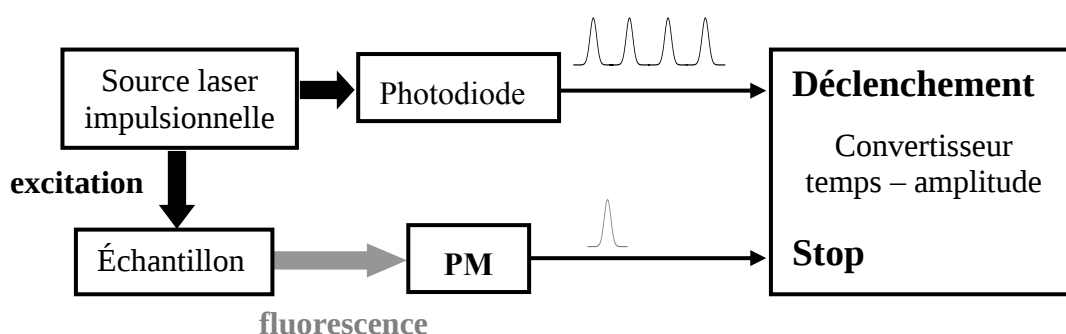


Figure I.5.3 : Principe de la technique d'acquisition de déclins de fluorescence par la méthode de comptage de photons uniques corrélés en temps. Le train d'impulsions du laser sert de signal de déclenchement d'un convertisseur temps-amplitude. Chaque impulsion émise par le photomultiplicateur (PM) suite à la détection d'un photon de fluorescence sert de signal d'arrêt du convertisseur temps-amplitude.

Comme le suggère le nom de la technique, les mesures sont basées sur la détection de photons de fluorescence uniques. Plus précisément, il s'agit de réduire l'intensité incidente de manière à ce qu'un seul photon de fluorescence (ou moins) soit émis pour chaque impulsion excitatrice. Les photons uniques émis par l'échantillon excité sont détectés par un photomultiplicateur rapide (PM). Parallèlement, le train d'impulsions du laser est détecté par une photodiode rapide et le signal émis par la photodiode déclenche, à chaque impulsion laser, un convertisseur temps-amplitude (CTA). Celui génère alors une tension continue qui augmente linéairement en fonction du temps. L'arrivée d'une impulsion électronique

correspondant à la détection d'un photon par le PM sert alors de signal d'arrêt pour le CTA et la tension générée est proportionnelle à l'écart temporel entre l'arrivée de l'impulsion laser excitatrice et l'arrivée d'un photon de fluorescence (fig I.5.4-a). Cette valeur de la tension correspond donc à un photon détecté à un temps Δt après l'arrivée de l'impulsion laser. En réitérant cette mesure plusieurs fois, le déclin de fluorescence peut être construit sous la forme d'un histogramme sur lequel on reporte le nombre de photons détectés pour chaque valeur du décalage temporel Δt entre l'arrivée d'une impulsion et d'un photon de fluorescence (fig I.5.4-b).

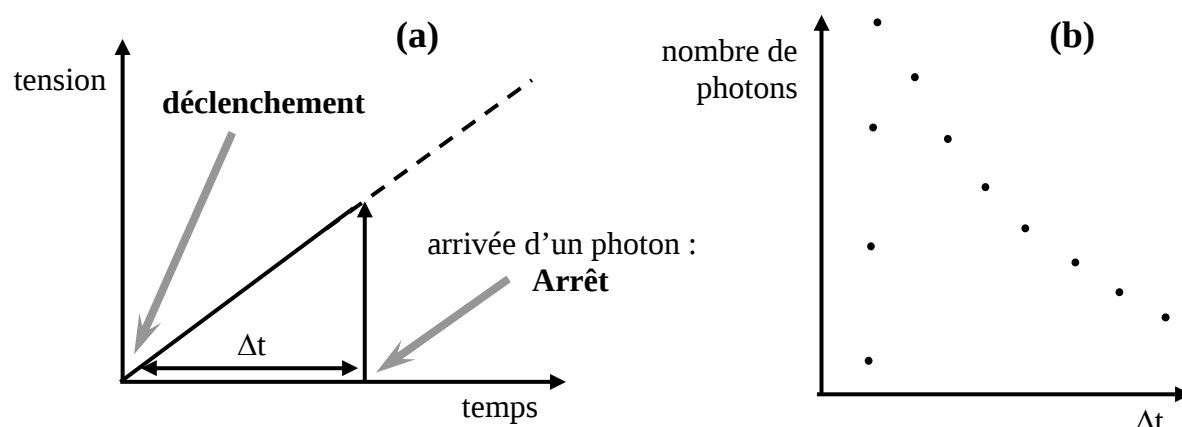


Figure I.5.4 : description du mode de fonctionnement du CTA pour l'acquisition de déclins de fluorescence. (a) le décalage temporel entre l'arrivée d'une impulsion laser et l'arrivée d'un photon est déterminé grâce à la rampe de tension générée par le CTA, (b) le déclin de fluorescence est construit, après plusieurs mesures, sous forme d'histogramme.

Les acquisitions de déclins de fluorescence par la méthode de CPUCT requièrent l'utilisation de détecteurs ultra-rapides et caractérisés par un gain élevé, de type photomultiplicateurs à galette de microcanaux ou photodiodes à avalanche [Hungerford 1996]. Ces détecteurs sont en effet caractérisés par une réponse temporelle très rapide (temps de montée ~ 150 ps), un gain élevé (typiquement supérieur à 10^6), et un niveau de bruit très faible (le courant d'obscurité ne génère pas plus de 100 coups/s). Nous préciserons par ailleurs, qu'étant donné le mode de fonctionnement de la technique (comptage de photons uniques), on évite ici certains effets négatifs liés généralement à l'utilisation de PM comme par exemple certains problèmes de non-linéarité du gain avec l'intensité détectée.

Il faut préciser un point important sur le fonctionnement du convertisseur temps-amplitude (CTA). En effet, entre l'arrivée de deux impulsions consécutives, il existe un temps mort pendant lequel le CTA se réinitialise (remise à zéro de la tension). Généralement, les CTA

peuvent fonctionner selon le principe exposé ci-dessus pour une fréquence maximale des impulsions de déclenchement d'environ 1 à 2×10^5 Hz. Si la cadence des impulsions laser excitatrice est très élevée et que cette remise à zéro ne peut être effectuée entre l'arrivée de deux impulsions consécutives, des distorsions apparaissent dans les déclin de fluorescence et induisent des erreurs lors du traitement des données. Dans ce cas, ces problèmes sont évités en utilisant le CTA dans un mode de fonctionnement inverse : l'arrivée d'un photon de fluorescence sert de signal de déclenchement du CTA et la mesure est stoppée par l'arrivée de l'impulsion laser. Afin de respecter la fréquence maximale admise par le CTA, il est nécessaire de contrôler la fréquence des impulsions correspondant à la détection d'un photon de fluorescence. Pour cela, l'intensité de l'excitation est atténuée de manière à limiter le taux de comptage c'est-à-dire le nombre de photons détectés par seconde à une valeur maximale d'environ 10^5 (environ 1 photon détecté toute les 1000 impulsions).

Une limitation pour l'analyse de durées de vie longues peut alors provenir de l'utilisation de sources laser impulsionnelles caractérisées par un taux de répétition élevé. En effet, une cadence typique de 80 MHz ne permet l'acquisition d'un déclin que sur l'espace temporel séparant deux impulsions consécutives, c'est-à-dire 13 ns. La technique sera dans ce cas limitée à l'étude de durées de vie inférieures à 10 ns environ. Ce problème peut être facilement résolu grâce à l'utilisation d'un sélecteur d'impulsions (fonctionnement basé sur une cellule électro-optique) qui permet une diminution de la fréquence des impulsions (typiquement, on peut obtenir des fréquences variant de 4 MHz à 10 kHz). Dans ce cas, la technique n'est plus limitée et permet aussi bien la mesure de déclin caractérisés par des durées de vie courtes que très longues et ceci sans modification des conditions d'acquisition. L'acquisition de déclin par CPUCT sera donc adaptée à l'étude d'une gamme de molécules et de processus dynamiques étendue. Notons néanmoins que la durée totale d'acquisition d'un déclin de fluorescence sera d'autant plus longue que la fréquence des impulsions sera faible.

En terme de résolution temporelle, les limitations proviennent majoritairement des systèmes électroniques employés. Les systèmes disponibles à ce jour sont néanmoins extrêmement rapides. La réponse instrumentale des systèmes de comptage de photons uniques est typiquement caractérisée par une largeur temporelle de 50 ps. De meilleures résolutions temporelles peuvent être obtenues par un traitement spécifique des données : suite à une procédure analytique de déconvolution du déclin de fluorescence enregistré par la réponse

instrumentale du système, il est possible d'accéder à de meilleures résolutions temporelles, typiquement de 20 ps environ.

Notons cependant que la détermination extrêmement précise des durées de vie de fluorescence grâce à la technique de CPUCT s'effectue au détriment de la rapidité d'acquisition. Expérimentalement, pour obtenir une bonne précision lors du traitement des données, un déclin de fluorescence devra être caractérisé par une amplitude maximale d'au moins 10^4 photons comptés pour un déclin mono-exponentiel. L'accumulation des données devra être plus longue pour des déclins contenant plusieurs durées de vie. Pour obtenir une bonne précision dans les résultats, la durée d'acquisition typique d'un déclin de fluorescence par CPUCT varie généralement de une à plusieurs minutes. Malgré ces durées d'acquisition longues, la technique est très appréciée et souvent utilisée expérimentalement en raison de sa sensibilité, sa précision et de ses capacités de résolution temporelle (quelques exemples : [Lossau 1996, Schoutteten 1999, Volkmer 2000]). Nous noterons d'ailleurs que des systèmes commerciaux de CPUCT qui comportent l'électronique requise pour l'acquisition des déclins et des logiciels de traitement de données ont récemment fait leur apparition (Société Becker&Hickl GmbH, Allemagne et PicoQuant GmbH, Allemagne).

Acquisition de déclins de fluorescence par échantillonnage temporel du déclin de fluorescence.

Cette dernière technique d'acquisition de déclins de fluorescence par échantillonnage temporel du déclin est basée sur l'utilisation de détecteurs à portes temporelles ultra-rapides (photomultiplicateurs, galettes de microcanaux). Le principe consiste, suite à l'excitation de molécules par une impulsion ultra-brève, à mesurer l'intensité de fluorescence émise dans des intervalles de temps courts et à renouveler cette mesure périodiquement de manière à balayer et à reconstituer le déclin de fluorescence dans sa totalité (figure I.5.5) [Draajer 1995].

Comme la technique n'est plus basée sur le mode de comptage de photons uniques, mais sur une mesure d'intensité de fluorescence, la durée d'acquisition d'un déclin est plus rapide que dans le cas de la technique de CPUCT. La résolution temporelle est ici limitée par la largeur des portes temporelles utilisées lors de l'acquisition (~100ps) mais permettent néanmoins une détermination des durées de vie très précise (précision de 10ps) [Dowling 1998].

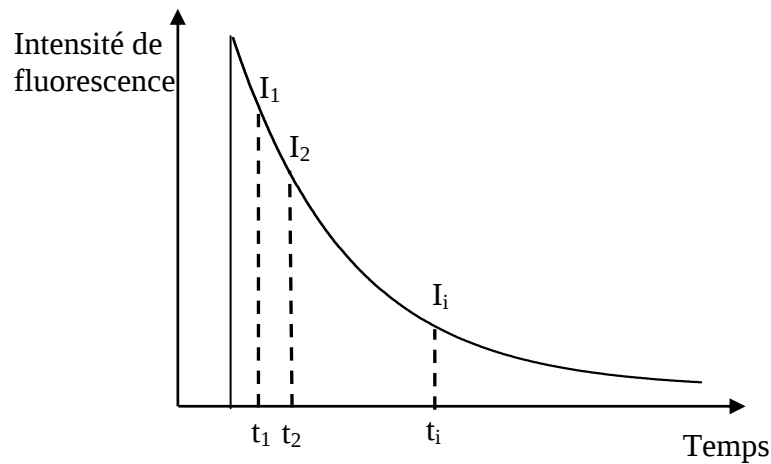


Figure I.5.5 : Principe de la technique d'acquisition de déclin de fluorescence par échantillonnage temporel du déclin de fluorescence : à différents temps t_i après l'excitation, l'intensité de fluorescence émise I_i est mesurée jusqu'à reconstitution du déclin de fluorescence.

Dans la plupart des cas, les mesures expérimentales de durées de vie par cette technique s'effectuent grâce à l'utilisation de deux portes temporelles seulement et permet une réduction considérable des durées d'acquisition (typiquement 10 à 100 μs par déclin) (figure I.5.6) [Sanders 1995, Sytsma 1998, Vroom 1999]. Néanmoins, ce gain en terme de rapidité d'acquisition s'effectue au détriment de la précision des mesures.

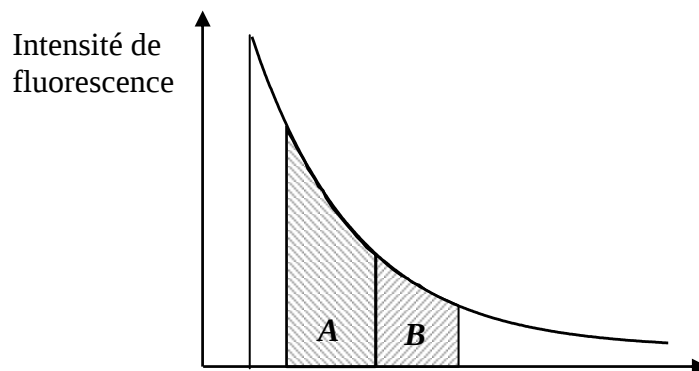


Figure I.5.6 : illustration du principe d'acquisition de déclin de fluorescence avec deux portes temporelles A et B .

Pour un déclin mono-exponentiel, la durée de vie de fluorescence est alors calculée suivant la relation suivante :

$$\tau_F = \frac{\Delta t}{\ln(I_A / I_B)}, \quad (\text{I.5.8})$$

où Δt est le décalage temporel entre les deux intervalles A et B d'acquisition, I_A et I_B sont les intensités respectivement mesurées dans ces deux fenêtres.

Précisons que l'équation I.5.6 n'est applicable que dans le cas où les deux portes A et B sont de même largeur temporelle et de durée inférieure à $2,5\tau_F$ et à condition que l'impulsion excitatrice soit très courte comparée à la durée de vie.

Dans le cas d'un déclin multiexponentiel, la durée de vie déterminée à partir de l'équation I.5.6 sera considérée comme une valeur moyenne des différentes composantes présentes dans le déclin. Cette estimation pourra être suffisante si l'on désire uniquement visualiser d'éventuelles modifications des durées de vie sans chercher à les déterminer plus exactement.

I.5.3. Imagerie des durées de vie de fluorescence.

Les différentes méthodes de mesures des durées de vie de fluorescence présentées au paragraphe précédent sont limitées à des études ponctuelles. Dans le cadre d'applications biologiques, ces études en un point peuvent se révéler insuffisantes. Les techniques de mesures de durées de vie de fluorescence peuvent alors être combinées aux techniques d'imagerie utilisées en microscopie de fluorescence champ-large, confocale ou biphotonique [Draajer 1995] permettant de reconstituer des images, codées en fausses couleurs des durées de vie de fluorescence. Nous préciserons que, parmi les techniques décrites ci-dessus, la mesure de durées de vie par fluorimétrie de phase et l'acquisition des déclins par échantillonnage temporel sont les deux méthodes principalement utilisées pour l'imagerie. En effet, l'imagerie *in vivo* des durées de vie de fluorescence nécessite des acquisitions très rapides afin de limiter les effets de dégradation des échantillons à l'excitation.

En microscopie champ-large, l'échantillon est éclairé entièrement et uniformément. On utilise dans ce cas un détecteur sensible à la position qui est typiquement une caméra CCD intensifiée dont le gain est modulé à la même fréquence que l'excitation pour des mesures par fluorimétrie de phase, ou munie de portes temporelles ultra-rapides pour des mesures par échantillonnage du déclin [Draajer 1995].

En fluorimétrie de phase, il s'agit d'enregistrer plusieurs images de l'intensité de fluorescence émise pour différentes valeurs de déphasage entre la phase du détecteur et celle du signal de fluorescence. Après traitement, la phase ϕ et le facteur de démodulation de chaque pixel sont déterminés et il est ainsi possible de reconstituer des images résolues en temps de l'échantillon observé.

De même, la technique de mesure de déclins par échantillonnage temporel nécessite l'acquisition de deux images d'intensité de fluorescence (une image pour chaque porte

temporelle). La durée de vie est alors déterminée selon l'équation I.5.6 pour chaque pixel et les images d'intensité sont ainsi transformées en images des durées de vie de fluorescence.

Ces techniques d'imagerie des durées de vie en microscopie champ large permettent des acquisitions rapides d'images en deux dimensions. Précisons néanmoins que cette méthode, en raison du mode d'excitation, ne permet pas d'accéder à de très bonnes résolutions spatiales. De plus, l'utilisation du mode d'excitation par absorption à deux photons est dans ce cas exclue.

Afin d'obtenir des images résolues à la fois spatialement et temporellement, les techniques de mesures des durées de vie de fluorescence sont combinées aux techniques d'imagerie de l'intensité de fluorescence présentées au paragraphe I.3 [Draajer 1995]. Plus précisément, il s'agit d'utiliser les techniques de microscopie confocale ou biphotonique à balayage laser ou utilisant un disque de Nipkow en association avec le système de détection de type caméra CCD intensifiée. Comme dans le cas de la microscopie champ-large, les deux techniques de mesures des durées de vie par fluorimétrie de phase ou par échantillonnage temporel sont utilisables. Alternativement, un détecteur de type photomultiplicateur peut être employé, mais nécessitera une reconstitution de l'image point par point.

I.5.4. Domaines d'applications de l'analyse et imagerie de durée de vie de fluorescence.

Les domaines d'applications des techniques d'analyse et d'imagerie des durées de vie de fluorescence sont très vastes et variés. Nous citerons ici brièvement les applications courantes et les possibilités d'études ouvertes par ces techniques.

Applications à la biologie cellulaire.

Le domaine d'applications le plus exploité à ce jour en imagerie de durées de vie de fluorescence est celui de la biologie cellulaire [Bastiaens 1999]. Les cellules réagissent typiquement à des changements de leur environnement biochimique qui peuvent se traduire par des associations ou modifications de conformations de macromolécules (protéines, lipides), un changement de l'activité cellulaire suite à une interaction spécifique, des variations de concentrations ioniques (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , O_2) ou du pH intracellulaire. En raison de la sensibilité et du très bon contraste apporté par l'imagerie de durées de vie de fluorescence, la technique est particulièrement bien appropriée à l'étude de ces processus biochimiques pour une meilleure compréhension du métabolisme cellulaire. Ainsi, l'imagerie de durées de vie de fluorescence est déjà couramment utilisée pour des mesures de

concentrations ioniques ou de pH en milieu cellulaire [Sanders 1995, Gerritsen 1997, Szmanski 1997]. La technique a par ailleurs déjà été appliquée *in vivo* à l'étude de diverses interactions (interactions sondes moléculaires - ADN, protéine - protéine, etc) et de processus dynamiques [Kemnitz 2001].

Les interactions et les différents processus dynamiques au sein de la cellule (interactions protéines - protéines, interaction d'une espèce moléculaire spécifique avec son site récepteur...) sont d'autre part souvent étudiées indirectement en suivant les modifications des durées de vie de fluorescence suite à un processus de transfert d'énergie [Bastiaens 2001]. Les études de transfert d'énergie sont basées sur l'étude de deux fluorophores, l'un appelé donneur, l'autre accepteur [Lakowicz 1983c]. Le fluorophore donneur doit être caractérisé par un spectre d'émission de fluorescence recouvrant partiellement le spectre d'absorption du fluorophore accepteur. Le processus de transfert d'énergie entre deux molécules est représenté sur la figure I.5.7.

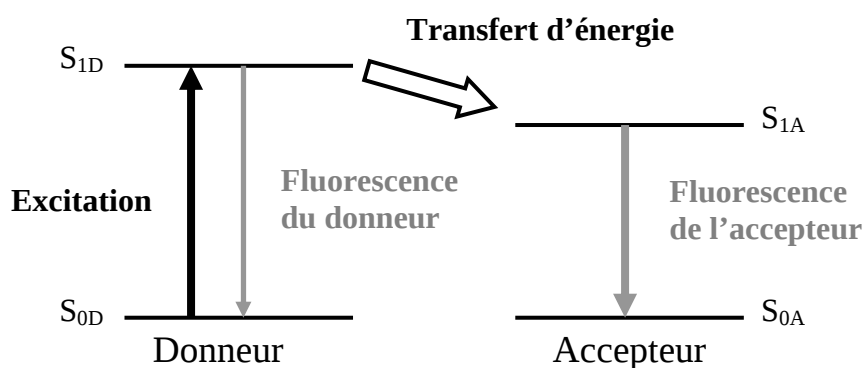


Figure I.5.7 : illustration du processus de transfert d'énergie entre deux molécules. S_{0A} et S_{0D} représentent respectivement l'état fondamental du donneur et celui de l'accepteur. S_{1A} et S_{1D} sont les états excités singulets de ces deux molécules.

Suite à l'excitation du fluorophore donneur (transition $S_{0D} \rightarrow S_{1D}$), une partie de l'énergie de cette molécule est transférée vers l'état excité singulet S_{1A} du fluorophore accepteur, de plus basse énergie que le niveau excité singulet S_{1D} du donneur. Le passage du fluorophore accepteur à l'état fondamental S_{0A} s'effectue alors avec l'émission de photons de fluorescence. L'intensité de fluorescence du fluorophore donneur sera donc d'autant plus diminuée que le transfert d'énergie sera efficace.

La probabilité K de transfert d'énergie entre deux molécules est définie par [Valeur 1993]:

$$K = \frac{1}{\tau_{FD}} \left(\frac{R_0}{R_{AD}} \right)^6, \quad (I.5.9)$$

où τ_{FD} est la durée de vie du fluorophore donneur (en l'absence du fluorophore accepteur), R_{AD} la distance entre les fluorophores donneur et accepteur, R_0 une distance caractéristique appelée distance de Förster.

La distance de Förster est définie de la manière suivante :

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 Q_D J}{128 \pi^2 N_A n^4}, \quad (I.5.10)$$

avec :

- κ^2 un facteur décrivant l'orientation relative dans l'espace des dipôles de transition des fluorophores donneur et accepteur :

$$\kappa = \cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_A \cos \theta_D, \quad (I.5.11)$$

où θ_{DA} est l'angle entre les dipôles de transition des fluorophores donneur et accepteur, θ_A est l'angle entre le dipôle de transition du fluorophore accepteur et le vecteur $\vec{R}_{AD}$, θ_D est l'angle entre le dipôle de transition du fluorophore donneur et le vecteur $\vec{R}_{AD}$ (figure I.5.8),

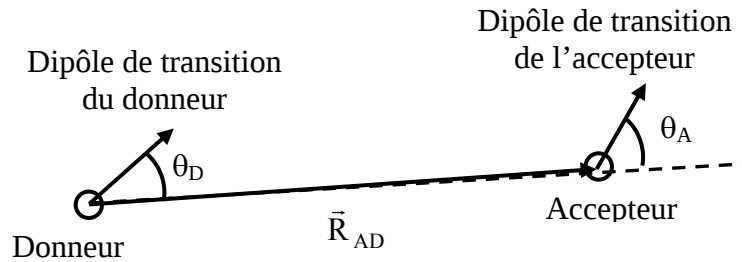


Figure I.5.8 : représentation des angles θ_A et θ_D .

- Q_D le rendement quantique de fluorescence du fluorophore donneur en l'absence de l'accepteur,
 - J une intégrale de recouvrement entre les spectres de fluorescence du donneur et d'absorption de l'accepteur, définie par :

$$J = \int_0^{\infty} I_{FD}(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (I.5.12)$$

où $I_{FD}(\lambda)$ représente le spectre en longueur d'onde normalisée de l'intensité de fluorescence du fluorophore donneur, $\varepsilon(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire du fluorophore accepteur et λ la longueur d'onde d'excitation,

- N_A le nombre d'Avogadro,
- n l'indice de réfraction du milieu.

Considérant les équations I.5.9 et I.5.10, le transfert d'énergie entre deux molécules nécessite une certaine proximité entre les deux molécules concernées mais dépend aussi de l'orientation de leurs dipôles de transitions.

Un transfert d'énergie entre deux fluorophores a pour conséquence une diminution de l'intensité et de la durée de vie de la fluorescence émise par le donneur. Les mesures de la variation de la durée de vie de fluorescence du donneur permettent alors une mesure quantitative de l'efficacité de transfert d'énergie entre les deux molécules et renseignent sur la proximité des deux espèces moléculaires. Les éventuelles interactions entre deux entités peuvent ainsi être analysées, le transfert d'énergie étant d'autant plus efficace que les molécules sont proches l'une de l'autre. Notons que l'analyse *in vivo* de processus dynamiques via un mécanisme de transfert d'énergie est de plus en plus exploitée depuis la découverte de la protéine GFP (green fluorescent protein), naturellement fluorescente [Tsien 1998] (voir chapitre III, paragraphe III.2.3). Les molécules de GFP sont de très bons candidats pour les études de transfert d'énergie en raison de l'existence de mutants dont les spectres d'absorption et d'émission remplissent les conditions requises. De plus, les possibilités d'expression par une protéine du gène codant la GFP sont très appréciées par les biologistes et ouvrent de nouvelles voies d'études.

Applications au domaine médical.

Le potentiel des techniques de mesure et d'imagerie des durées de vie de fluorescence est par ailleurs grandement utilisé dans le domaine médical. La présence de fluorophores endogènes dans les tissus offre par exemple la possibilité d'analyser les changements morphologiques caractéristiques de tissus malades. Dans ce contexte, il a été démontré expérimentalement que les techniques de mesures de durées de vie de fluorescence étaient capable de distinguer la fluorescence émise par des tissus malades de celle émise par des tissus sains [Cubeddu 1993 et 1995, Anderson-Engels 2000]. Ainsi, ces techniques d'imagerie de la fluorescence résolue en temps devraient permettre la détection de cancer à un

stade précoce du développement de la maladie sans perturbation majeure du milieu par rapport aux procédés de biopsies habituels.

Applications au domaine pharmacologique.

Les techniques de fluorescence résolue en temps permettent aussi l'étude des interactions entre une molécule médicament (molécules antitumorales, ...) et sa cible biologique (acide aminé, ADN) pour une meilleure compréhension du mode d'action de ces médicaments [Fontaine-Aupart 1996, Steenkeste 2001]. La mesure de durées de vie de fluorescence dans ce contexte peut ainsi avoir des applications intéressantes dans le domaine de la pharmacologie dans lequel la recherche de nouveaux médicaments est constante. C'est notamment dans ce domaine que s'inscrivent les applications que nous présenterons dans le chapitre IV.

L'analyse et l'imagerie de durées de vie de fluorescence sont donc des techniques très prometteuses qui peuvent être utilisées dans des domaines d'applications variés. Nous noterons que les modes d'excitation de la fluorescence par absorption monophotonique et biphotonique conduisent à des résultats similaires. Néanmoins, de nombreux avantages sont liés à l'utilisation de la technique de microscopie par EDP (paragraphe I.2.3) pour l'étude d'échantillons biologiques, technique qui est à ce jour encore peu utilisée. Ainsi, c'est dans ce contexte que se situe notre projet de développement d'un système complet de microscopie de fluorescence par EDP. Il permettra l'acquisition d'images d'intensité de fluorescence mais aussi l'analyse *in vitro* ou *in vivo* de processus dynamiques grâce aux techniques de corrélation de fluorescence et d'imagerie de durées de vie. La mise en place de notre dispositif expérimental ainsi que les résultats obtenus grâce à ces deux techniques seront exposés dans les chapitres suivants.

Chapitre II

Mise en place et caractérisation de la source laser pour l'EDP

Ce deuxième chapitre présente une étude de caractérisation de la source laser que nous avons utilisée, étude préliminaire importante lors de la mise en place d'un système de microscope de fluorescence par excitation à deux photons. Nous avons en effet montré dans le chapitre précédent que le rendement de fluorescence par absorption à deux photons dépend fortement de la densité de photons incidents sur l'échantillon. L'obtention de conditions d'excitation à deux photons optimales requiert donc une concentration de l'énergie incidente dans les domaines temporel et spatial. Typiquement, ces conditions sont satisfaites par l'utilisation de sources laser impulsionsnelles femtosecondes dont le rayonnement est focalisé grâce à des objectifs de grande ouverture numérique. Néanmoins, les impulsions femtosecondes ont tendance à s'allonger temporellement de manière non négligeable en traversant un milieu dispersif, comme l'objectif d'un microscope. Il paraît donc nécessaire de contrôler la durée des impulsions servant à l'excitation de la fluorescence, c'est-à-dire au foyer des objectifs de microscope.

Dans ce chapitre, nous décrirons la source laser femtoseconde utilisée : le laser à saphir dopé au titane. Nous présenterons le processus de dispersion de la vitesse de groupe, son influence sur la durée des impulsions et la méthode de compensation que nous avons choisie. Nous décrirons ensuite les deux dispositifs expérimentaux que nous avons réalisés pour la mesure de la durée des impulsions : d'une part, l'autocorrélateur « traditionnel » basé sur le processus de génération du second harmonique et d'autre part, une méthode d'autocorrélation relativement récente, basée sur le processus d'absorption à deux photons et permettant des mesures au foyer d'objectifs de grande ouverture numérique. La mise en place de ces différents dispositifs d'autocorrélation optique constituera un ensemble complet pour la mesure et la compensation efficace de la dispersion de la vitesse de groupe introduite par nos objectifs de microscope pour une efficacité maximale du processus d'excitation à deux photons.

II.1. Le laser à saphir dopé au titane.

La source la mieux adaptée pour les applications de microscopie par absorption à deux photons est le laser à saphir dopé au titane [Fischer 1997, Wokosin 1996]. En effet, il est à ce jour la seule source capable de générer des impulsions de durée inférieure ou égale à 100 fs, à une fréquence de répétition élevée (~ 100 Mhz) et accordable en longueur d'onde de 690 à 1000 nm [Spence 1991]. Cette large gamme permettra l'excitation de la fluorescence d'un grand nombre de molécules. Dans le cadre de notre projet, nous utiliserons une source laser

commerciale à saphir dopé au titane : le modèle MIRA 900-F (Coherent), pompé en régime continu à 532 nm avec une puissance de 5 W par un laser tout solide pompé par diode (laser à Nd:vanadate (Nd:YVO₄) doublé en fréquence grâce à un cristal de LBO, VERDI Coherent). L'utilisation de sources laser à l'état solide présente certains intérêts : ces sources sont compactes, très stables et ne nécessitent que très peu d'entretien (en comparaison au laser à saphir dopé au titane pompé par laser argon).

La génération d'impulsions ultrabrèves requiert l'utilisation de matériaux caractérisés par un spectre d'émission de fluorescence large, la durée des impulsions $\Delta\tau$ étant inversement proportionnelle à la largeur du spectre en fréquence $\Delta\nu$ (principe d'incertitude d'Heisenberg: $\Delta\nu\Delta\tau \geq \text{cte}$). Le cristal de saphir dopé au titane est caractérisé par un spectre d'absorption s'étalant de 400 à 600 nm et une large bande de fluorescence entre 650 et 1100 nm présentant un maximum à 750 nm [Moulton 1986]. Ce cristal constitue donc un excellent candidat pour la production d'impulsions femtosecondes. Nous rappellerons ici brièvement le principe de fonctionnement de l'oscillateur femtoseconde à saphir dopé au titane (figure II.1.1) [Salin 1987].

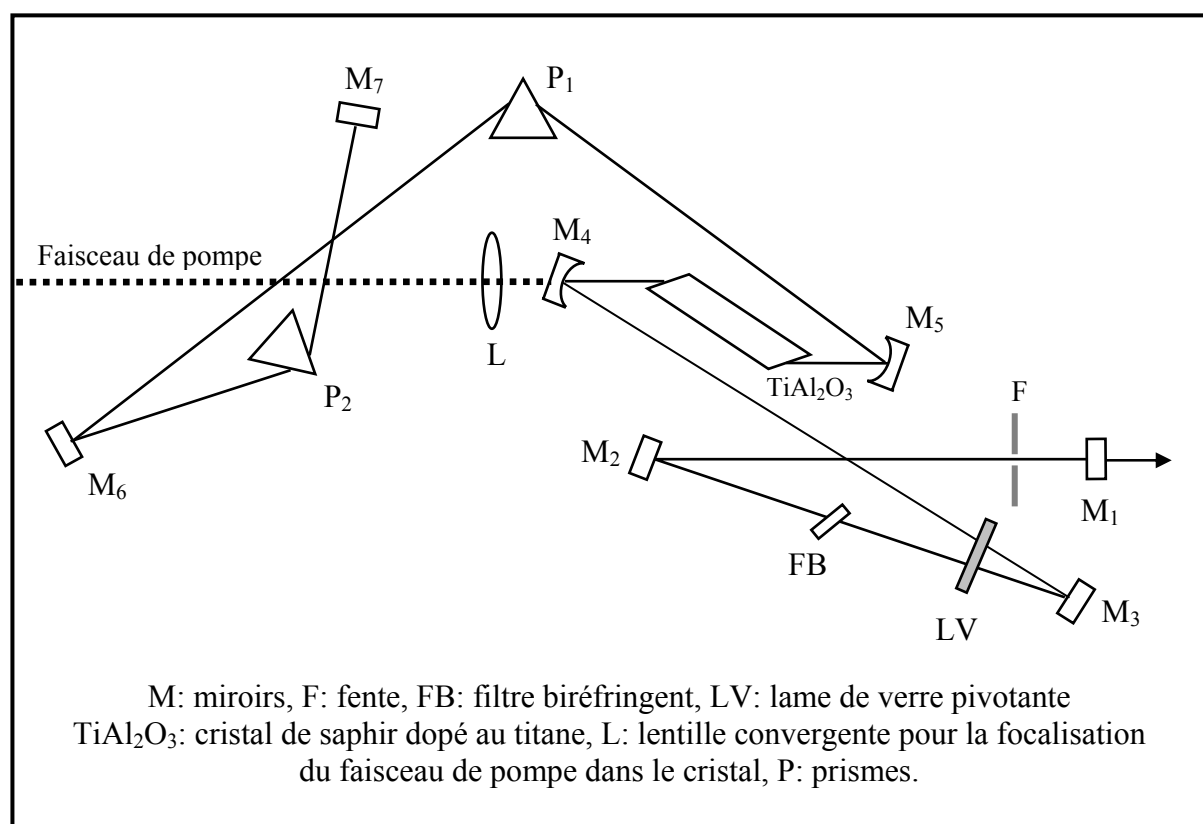


Figure II.1 1: Schéma de l'oscillateur laser femtoseconde à saphir dopé au titane.

L'oscillateur laser utilise donc comme milieu à gain le cristal de saphir dopé au titane. L'inversion de population est réalisée au moyen du laser de pompe focalisé dans le cristal par la lentille convergente L. La méthode utilisée pour la production d'impulsions est le verrouillage de modes passif basé sur l'effet Kerr [Spence 1991]. Lorsque la densité de puissance crête dans la cavité, et donc dans le cristal, est très élevée, il apparaît une variation non linéaire de l'indice de réfraction du milieu : l'effet Kerr. Le cristal se comporte alors comme une lentille convergente. C'est le phénomène d'autofocalisation. Cette autofocalisation est à l'origine du verrouillage en phase des modes de la cavité. Il se traduit par une diminution de la section du faisceau. Si le laser fonctionne en mode continu, le phénomène non linéaire d'autofocalisation ne peut avoir lieu, et la section du faisceau est plus grande. Il suffit alors d'introduire dans la cavité une fente, dont l'ouverture est plus petite que le diamètre du faisceau continu mais plus grande que la section du faisceau impulsif. Cette fente va être à l'origine de pertes plus importantes pour le régime continu que pour le régime impulsif (figure II.1.2). L'oscillateur fonctionne ainsi préférentiellement en régime impulsif.

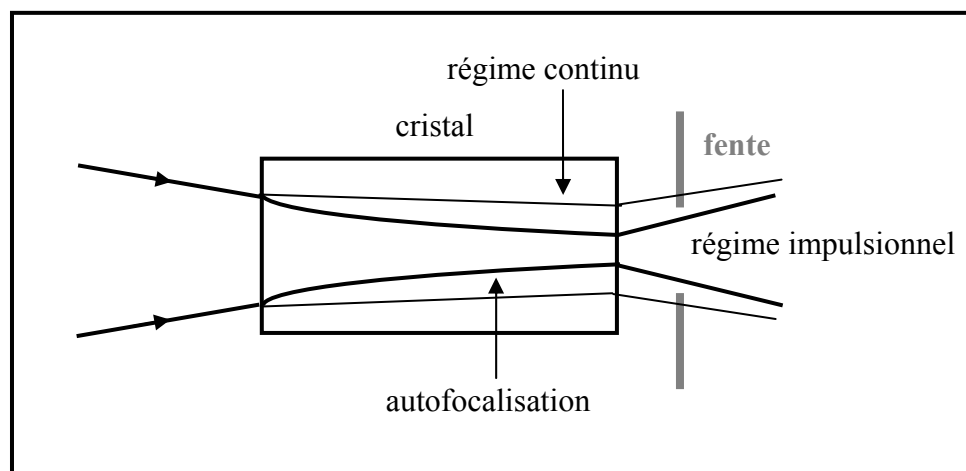


Figure II.1.2: illustration du phénomène d'autofocalisation par effet Kerr et sélection par une fente du régime impulsif.

Cependant, un oscillateur à saphir dopé au titane pompé en continu est stable en mode continu les non-linéarités du cristal n'étant pas suffisantes pour démarrer le verrouillage de modes par effet Kerr. Le mode de fonctionnement impulsif est ici amorcé grâce à un système créant une perturbation dans la cavité à l'aide d'une lame de verre (LV) montée sur un galvanomètre (l'oscillation de la lame induit des variations rapides de la longueur de la cavité et donc des battements de modes qui induisent une modulation temporelle).

Par ailleurs, les composants optiques de la cavité, en particulier le cristal de saphir dopé au titane, introduisent une dispersion de la vitesse de groupe positive conduisant à un élargissement temporel des impulsions. Pour obtenir les impulsions les plus courtes possible, la dispersion de la vitesse de groupe est compensée grâce au système de prismes P_1 et P_2 à dispersion de la vitesse de groupe négative (voir paragraphe II.2).

L'oscillateur à saphir dopé au titane génère ainsi des impulsions d'une durée de 100 fs environ, à un taux de répétition de 76 MHz et une puissance moyenne d'environ 1W (énergie par impulsion de 13 nJ). La polarisation du faisceau en sortie du laser est horizontale. La cavité de notre laser MIRA 900-F est d'autre part muni d'un jeu de miroirs large bande (miroirs X-Wave) permettant une accordabilité entre 690 et 1000 nm par rotation du filtre biréfringent (FB).

II.2. La dispersion de la vitesse de groupe : influence sur la durée des impulsions et compensation.

II.2.1. Le processus de dispersion de la vitesse de groupe.

Les impulsions ultrabrèves (durée inférieure à 100 fs) sont caractérisées par un spectre large, résultat direct de la relation de la transformée de Fourier :

$$\Delta\nu \Delta\tau \geq K, \quad (\text{II.2.1})$$

où $\Delta\nu$ est la largeur spectrale à mi-hauteur en hertz, $\Delta\tau$ est la durée de l'impulsion (largeur à mi-hauteur du profil temporel en intensité de l'impulsion) et K est une constante dépendant de la forme de l'impulsion.

Typiquement $K = 0,441$ pour des impulsions de forme Gaussienne et $K = 0,315$ pour des impulsions de forme sécante hyperbolique au carré, ces deux formes étant les modèles les plus couramment utilisés pour décrire une impulsion laser. L'égalité de la relation (II.2.1) correspond au cas où il n'y a pas de variation de la fréquence instantanée à travers l'impulsion, autrement dit, pas de dérive de fréquence. On dit alors que la largeur de l'impulsion est limitée par la transformée de Fourier. Malheureusement, les impulsions femtosecondes ne sont que très peu souvent limitées par la transformée de Fourier. En effet, lorsqu'une telle impulsion traverse un milieu isotrope et transparent, ses différentes composantes spectrales ne voient pas le même indice de réfraction. L'indice de réfraction n'étant pas constant, les différentes fréquences se propagent à des vitesses différentes et par conséquent se dispersent temporellement: c'est le phénomène de dispersion de la vitesse de groupe.

Supposons une impulsion de forme gaussienne dont le champ électrique s'écrit :

$$E(t) = E_0 \exp\left(-2 \ln 2 \frac{t^2}{\Delta\tau^2}\right) \exp(i\omega_0 t), \quad (\text{II.2.2})$$

où $\Delta\tau$ est la largeur à mi-hauteur du profil temporel en intensité de l'impulsion et ω_0 est la fréquence centrale de son spectre en fréquence.

Par transformée de Fourier, on détermine la répartition spectrale du champ électrique:

$$\tilde{E}(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} E(t) \exp(-i\omega t) dt, \quad (\text{II.2.3})$$

$$\text{soit, après calcul :} \quad \tilde{E}(\omega) = E'_0 \exp\left(-\frac{\Delta\omega^2 \Delta\tau^2}{8 \ln 2}\right), \quad (\text{II.2.4})$$

avec $E'_0 = \frac{E_0 \Delta\tau}{\sqrt{8 \ln 2}}$ et $\Delta\omega = \omega - \omega_0$.

Lorsqu'une impulsion traverse un milieu isotrope et transparent, elle subit un déphasage $\varphi(\omega)$. Ce déphasage peut-être développé en puissance de $(\omega - \omega_0)$. En limitant le développement aux trois premiers termes, ce déphasage s'écrit :

$$\varphi(\omega) = \varphi(\omega_0) + (\omega - \omega_0) \frac{\partial \varphi(\omega)}{\partial \omega} + \frac{1}{2} (\omega - \omega_0)^2 \frac{\partial^2 \varphi(\omega)}{\partial \omega^2}. \quad (\text{II.2.5})$$

On notera dans la suite du développement $\varphi(\omega_0) = \varphi_0$, $\frac{\partial \varphi(\omega)}{\partial \omega} = \varphi'$ et $\frac{\partial^2 \varphi(\omega)}{\partial \omega^2} = \varphi''$, φ'' correspondant au terme de dispersion de la vitesse de groupe.

Le champ électrique $\tilde{E}_s(\omega)$ à la sortie du milieu traversé s'écrit alors en fonction du champ $\tilde{E}(\omega)$ à l'entrée [Salin 1987]:

$$E_s(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \tilde{E}_s(\omega) \exp(i\omega t) dt,$$

$$\text{soit : } E_s(t) = \frac{E_0}{\sqrt{1 - i2a\varphi''}} \left[\exp i(\omega_0 t' + \varphi_0) \exp\left(-\frac{at'^2}{1 + 4a^2\varphi''^2}\right) \exp\left(-i \frac{2a^2\varphi'' t'^2}{1 + 4a^2\varphi''^2}\right) \right], \quad (\text{II.2.6})$$

où $t' = \varphi' + t$ et $a = \frac{2 \ln 2}{\Delta\tau^2}$.

Cette expression peut s'écrire sous la forme suivante :

$$E_s(t) = E_{0s} \exp\left(-2 \ln 2 \frac{t'^2}{\Delta\tau_s^2}\right) \exp[i(\omega_0 t' + \varphi_s(t))], \quad (\text{II.2.7})$$

avec $\varphi_s(t) = \varphi_0 - \frac{2a^2 \varphi'' t'^2}{1 + 4a^2 \varphi''^2}$.

La largeur à mi-hauteur $\Delta\tau_s$ du profil en intensité à la sortie du milieu est donc :

$$\Delta\tau_s = \sqrt{1 + \frac{4a^2 \varphi''^2}{a}} 2 \ln 2. \quad (\text{II.2.8})$$

La dispersion de la vitesse de groupe φ'' introduit donc un élargissement du profil temporel en intensité d'un facteur :

$$\frac{\Delta\tau_s}{\Delta\tau} = \sqrt{1 + \frac{\varphi''^2}{4\Delta\tau^4} (8 \ln 2)^2}. \quad (\text{II.2.9})$$

Cet élargissement s'accompagne d'une dérive des fréquences (ou "chirp") le long du profil temporel de l'impulsion (figure II.2.1). En effet, la fréquence instantanée est :

$$\omega(t') = \frac{\partial \varphi_s(\omega)}{\partial t'} = \omega_0 - \frac{4a^2 \varphi'' t'}{1 + 4a^2 \varphi''^2}. \quad (\text{II.2.10})$$

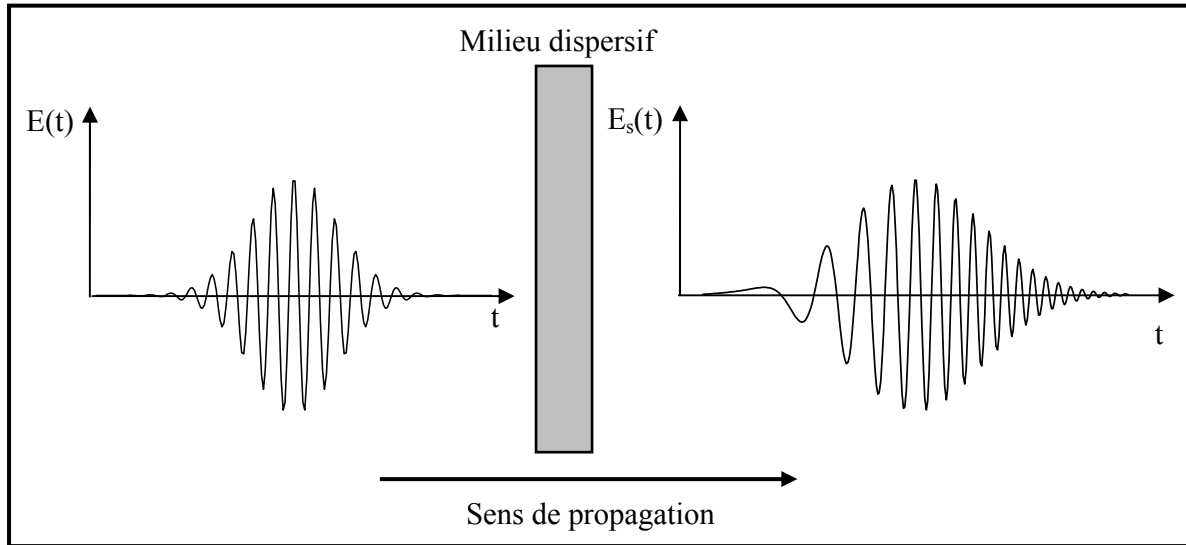


Figure II.2.1 : illustration des effets d'une dispersion de la vitesse de groupe positive : élargissement temporel des impulsions et dérive de fréquence.

Les fréquences sont donc linéairement réparties dans l'impulsion de telle façon que, pour une dispersion positive (cas de la plupart des composants optiques : lentilles, objectifs...) les basses fréquences voyagent plus vite que les hautes fréquences.

À titre d'exemple, le déphasage introduit par la traversée d'un milieu transparent, isotrope de longueur L et d'indice n est :

$$\varphi(\omega) = \frac{\omega}{c} n(\omega) L, \quad (\text{II.2.11})$$

où c est la célérité de la lumière.

Le terme de dispersion de la vitesse de groupe correspondant est donc :

$$\varphi'' = \frac{\lambda_0^3}{2\pi c^2} n''(\lambda) L \quad \text{avec} \quad n''(\lambda) = \left(\frac{\partial^2 n(\lambda)}{\partial \lambda^2} \right)_{\lambda_0}. \quad (\text{II.2.12})$$

La dispersion de la vitesse de groupe pourra donc être positive ou négative selon le signe de $n''(\lambda)$.

Les valeurs des indices et de leurs dérivées première et seconde par rapport à la longueur d'onde peuvent être calculées à partir de l'équation de Sellmeier (II.2.13), les valeurs des différentes constantes étant données par les constructeurs pour différents matériaux (catalogue Melles Griot):

$$n(\lambda) = \sqrt{\frac{B_1 \lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2 \lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3 \lambda^2}{\lambda^2 - C_3} + 1}. \quad (\text{II.2.13})$$

Le tableau II.2.1 donne les valeurs des indices et de la dispersion de la vitesse de groupe pour quatre types de verres plus ou moins dispersifs, calculées pour la longueur d'onde $\lambda = 800$ nm. À titre d'indication, nous mentionnons aussi les valeurs des indices et de la dispersion pour le saphir dopé au titane, cristal de notre laser.

	SiO ₂	LaK31	SF10	SF14	Ti ³⁺ :Al ₂ O ₃
n	1,4533	1,6876	1,7112	1,7434	1,7602
n' (μm⁻¹)	-0,01728	-0,0294	-0,0496	-0,0581	-0,0268
n'' (μm⁻²)	0,0398	0,0775	0,1755	0,2274	0,0641
φ'' (fs²)	361,03 L	701,54 L	1589,04 L	2059,10 L	580,35 L

Tableau II.2.1: valeurs de l'indice de quatre types de verres et du saphir dopé au titane et de leurs dérivées première et seconde par rapport à la longueur d'onde calculées à $\lambda = 800$ nm. La dispersion de la vitesse de groupe est donnée en fonction de l'épaisseur de matériau traversé (L en cm).

Nous constatons ici que la dispersion de la vitesse de groupe introduite est toujours positive, caractéristique observée pour tous les matériaux dans le visible et le proche infrarouge. Par ailleurs, en ce qui concerne les différents types de verre, la dispersion est d'autant plus élevée que l'indice linéaire du verre est grand.

Nous avons représenté sur la figure II.2.2 conformément à l'équation II.2.9 les variations de la durée d'impulsions gaussiennes en fonction de l'épaisseur de la lame traversée et du type de verre.

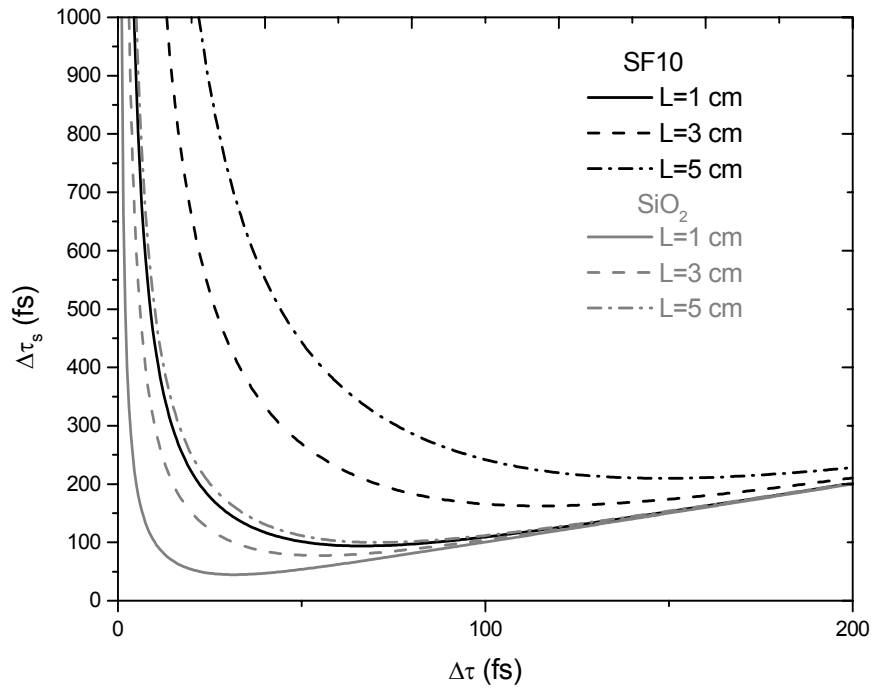


Figure II.2.2: évolution de la durée d'une impulsion gaussienne après la traversée d'un milieu dispersif pour deux types de matériau et de leur épaisseur.

Cette figure montre clairement que l'effet de la dispersion de la vitesse de groupe sur la durée des impulsions est d'autant plus important que l'impulsion de départ est courte et qu'il dépend fortement de l'épaisseur et du type de matériau traversé. On comprend donc ici l'importance de la compensation de la vitesse de groupe dans la propagation d'impulsions, et plus particulièrement à travers un objectif de microscope.

II.2.2. Compensation de la dispersion de la vitesse de groupe

Afin de compenser cette dispersion de la vitesse de groupe positive, il est nécessaire d'introduire, en sortie du laser, une dispersion de la vitesse de groupe négative. La solution couramment employée dans ce but est un système de quatre prismes identiques entre eux ou

deux prismes utilisés en aller-retour comme dans le cas de la cavité de notre laser (figure II.2.3) [Fork 1984].

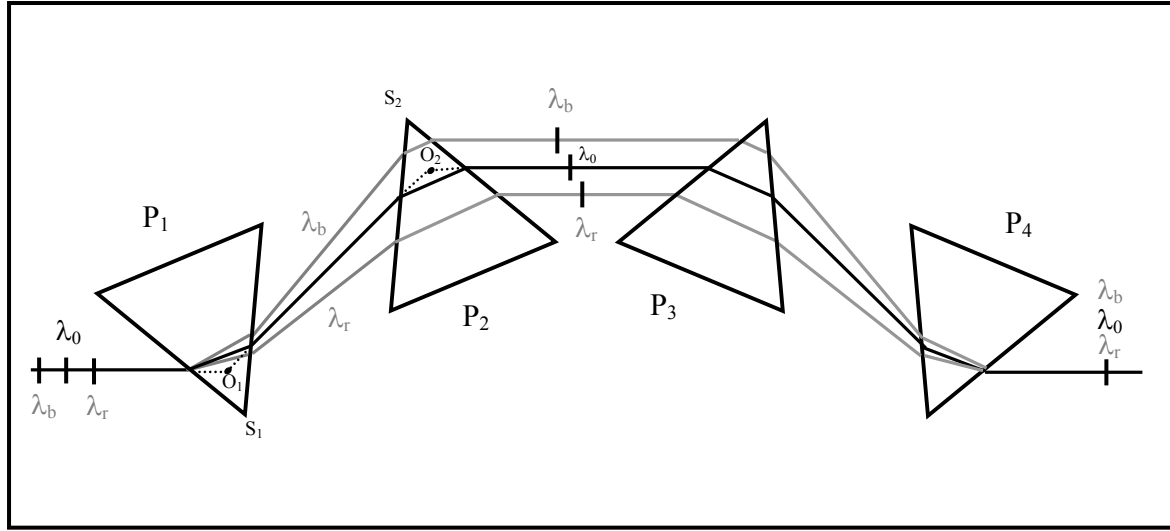


Figure II.2. 3 : Principe du système à quatre prismes utilisé pour la compensation des effets de dispersion positive d'ordre 2.

Considérons une impulsion dont le spectre est centré sur la longueur d'onde λ_0 . Schématiquement, si cette impulsion a subi une dispersion de vitesse de groupe positive, les longueurs d'onde les plus grandes (λ_r) sont en avance par rapport à λ_0 . Les plus petites longueurs d'onde (λ_b) sont quant à elles retardées. Le premier prisme P_1 va disperser angulairement les différentes composantes spectrales de l'impulsion. Les plus petites longueurs d'onde sont les plus déviées par P_1 et donc vont traverser moins de verre dans le deuxième prisme P_2 que les longueurs d'onde les plus grandes, de telle sorte que leur temps de trajet va être plus court. Les deux autres prismes, placés symétriquement par rapport aux deux premiers servent alors à doubler cet effet et à superposer les différentes longueurs d'ondes étalées transversalement.

La dispersion de la vitesse de groupe par un tel système de prismes s'exprime de la manière suivante [Fork 1984] :

$$\Phi''_{4\text{prismes}} = \frac{4\lambda_0^3}{\pi c^2} \left\{ -n'^2 L + e \left[\frac{n n''}{1 + n^2} + n'^2 \left(1 - \frac{1}{n^2 (1 + n^2)} \right) \right] \right\}, \quad (\text{II.2.14})$$

où L est la distance entre les deux premiers prismes définie par $L = O_1 O_2$ et e est l'épaisseur de verre traversée : $e = O_1 S_1 + O_2 S_2$.

On constate ici que la dispersion pourra être négative ou positive selon les valeurs de e , L , de l'indice et de ses dérivées. Afin de montrer les différentes caractéristiques à prendre en compte pour le choix du matériau constituant les prismes, nous avons calculé les valeurs de la dispersion pour les quatre types de verre présentés au paragraphe précédent (tableau II.2.2).

	SiO₂	LaK31	SF10	SF14
$\varphi''_{4\text{prismes}} \text{ (fs}^2\text{)}$	683,56e-10,81L	1259,20e-31,39L	2850,13e-89,04L	3667,41e-122,66L

Tableau II.2.2 : expressions de la dispersion de la vitesse de groupe introduite par un système de quatre prismes suivant la composition des prismes (L et e en cm).

Généralement, les verres dont l'indice est le plus faible sont les moins dispersifs. Par ailleurs, d'après le tableau II.2.2, la distance entre les prismes, nécessaire à la compensation de la vitesse de groupe diminue lorsque l'indice du matériau augmente. Un bon choix de l'indice permettra donc d'obtenir un système de prismes relativement compact. Cependant, lorsque l'indice est trop grand, le système devient difficile à régler étant donné la variation très rapide de la dispersion avec l'épaisseur de verre traversé. D'autre part, les effets de dispersion d'ordre supérieur à deux deviennent dans ce cas importants. Pour ces raisons, nous avons choisi pour compenser la dispersion introduite par nos objectifs de microscope, d'intégrer dans notre montage expérimental un système de deux prismes en silice (SiO₂) (montage en aller-retour, figure II.2.4). Ces prismes ont été taillés de manière à obtenir le minimum de déviation sous l'incidence de Brewster à $\lambda=800$ nm. Ils sont montés sur des platines de translation permettant un déplacement des prismes perpendiculairement à leur base.

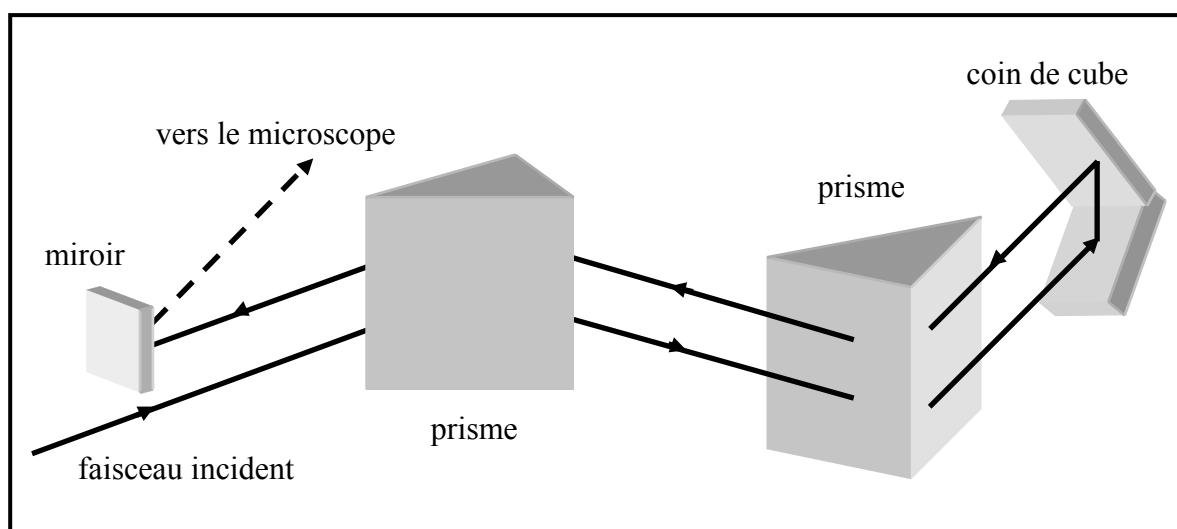


Figure II.2.4 : illustration du système de prismes utilisés en aller-retour intégré dans notre montage expérimental.

Un premier réglage de la dispersion négative introduite est effectué en intervenant sur la distance entre les deux prismes et un réglage fin est alors possible en faisant varier l'épaisseur de verre traversé e.

II.3. Mesure et contrôle de la durée des impulsions femtosecondes.

La mesure de la durée d'impulsions laser inférieure ou égale à 100 fs est problématique. Pour de telles impulsions, les systèmes électroniques actuels ne permettent pas des mesures directes de durées aussi courtes. Par exemple, les oscilloscopes à échantillonnage ont une résolution temporelle limitée à 25 ps environ, les caméras à balayage de fente les plus performantes sont quant à elles limitées à des mesures d'environ 400 fs. Il est par conséquent nécessaire de faire appel à des méthodes indirectes pour mesurer la durée d'impulsions femtosecondes, la plus courante d'entre elles étant l'autocorrélation optique par génération du second harmonique. Nous en distinguerons deux types:

- l'autocorrélation optique par génération du second harmonique non colinéaire, ou **autocorrélation en intensité** qui permet uniquement la mesure de la durée des impulsions,
- l'autocorrélation optique par génération du second harmonique colinéaire, ou **autocorrélation interférométrique**, dont l'avantage par rapport à la configuration non colinéaire est de donner plus d'informations sur la présence éventuelle d'une dérive de fréquence.

Nous présenterons aussi une technique d'autocorrélation relativement récente, basée sur le processus d'absorption à deux photons sur une diode de type GaAsP utilisée en détection. Cette technique permet une mesure simple de la durée des impulsions au foyer d'objectifs à immersion de grande ouverture numérique dont la distance frontale est très faible.

II.3.1. Autocorrélation optique par génération de second harmonique.

II.3.1.1. Autocorrélation optique par génération de second harmonique : principe.

Le principe de l'autocorrélateur optique est de transformer une information temporelle en une information spatiale plus facile à enregistrer.

La mesure de la durée d'impulsions ultra-courtes s'effectue au moyen de la fonction d'autocorrélation suivante :

$$g(\tau) = \frac{\int |\{E(t)E(t+\tau)\}|^2 dt}{\int |E^2(t)|^2 dt}, \quad (\text{II.3.1})$$

avec $E(t) = \xi(t) \exp i(\omega t + \phi(t))$, $\xi(t)$ définissant la forme de l'impulsion.

Dans toute la suite, nous ne considérerons que deux formes possibles pour $\xi(t)$: une gaussienne, ou une sécante hyperbolique carrée, modèles les plus couramment utilisés pour des impulsions laser.

Le principe de l'autocorrélateur optique est basé sur la détection de l'onde de seconde harmonique générée suite à la superposition, dans un cristal doubleur de fréquences, de deux impulsions identiques. La fonction d'autocorrélation est alors construite en décalant temporellement une impulsion par rapport à l'autre.

Le schéma du montage expérimental de l'autocorrélateur par génération du second harmonique est représenté sur la figure II.3.1. Il consiste en un interféromètre de Michelson modifié, où l'on a placé, sur l'un des bras, un coin de cube monté sur un pot vibrant.

Chaque impulsion incidente est divisée en deux impulsions d'égale intensité par une lame séparatrice LS. Dans le cas de l'autocorrélateur par génération de second harmonique non colinéaire, les faisceaux A et B sont réfléchis par les coins de cube de telle sorte qu'à la sortie de l'interféromètre, ils soient strictement parallèles mais non superposés. Une lentille focalise alors ces deux faisceaux dans un cristal non linéaire doubleur de fréquence. Nous utiliserons dans notre montage un cristal de BBO de 1 mm d'épaisseur taillé pour un accord de phase de type I à 800 nm. Le cristal est orienté de manière à satisfaire les conditions d'accord de phase. L'onde de second harmonique est alors générée sur la bissectrice de l'angle entre les trajectoires des deux trains d'impulsions lorsque ceux-ci sont superposés à la fois spatialement et temporellement dans le cristal. Grâce au coin de cube monté sur pot vibrant, on fait varier le décalage temporel entre les deux trains d'impulsions. L'intensité du signal à la seconde harmonique varie ainsi en fonction de la position du coin de cube. L'onde de second harmonique est alors filtrée et détectée par un photomultiplicateur connecté à un oscilloscope de manière à visualiser directement le signal de second harmonique généré en fonction de la position du coin de cube.

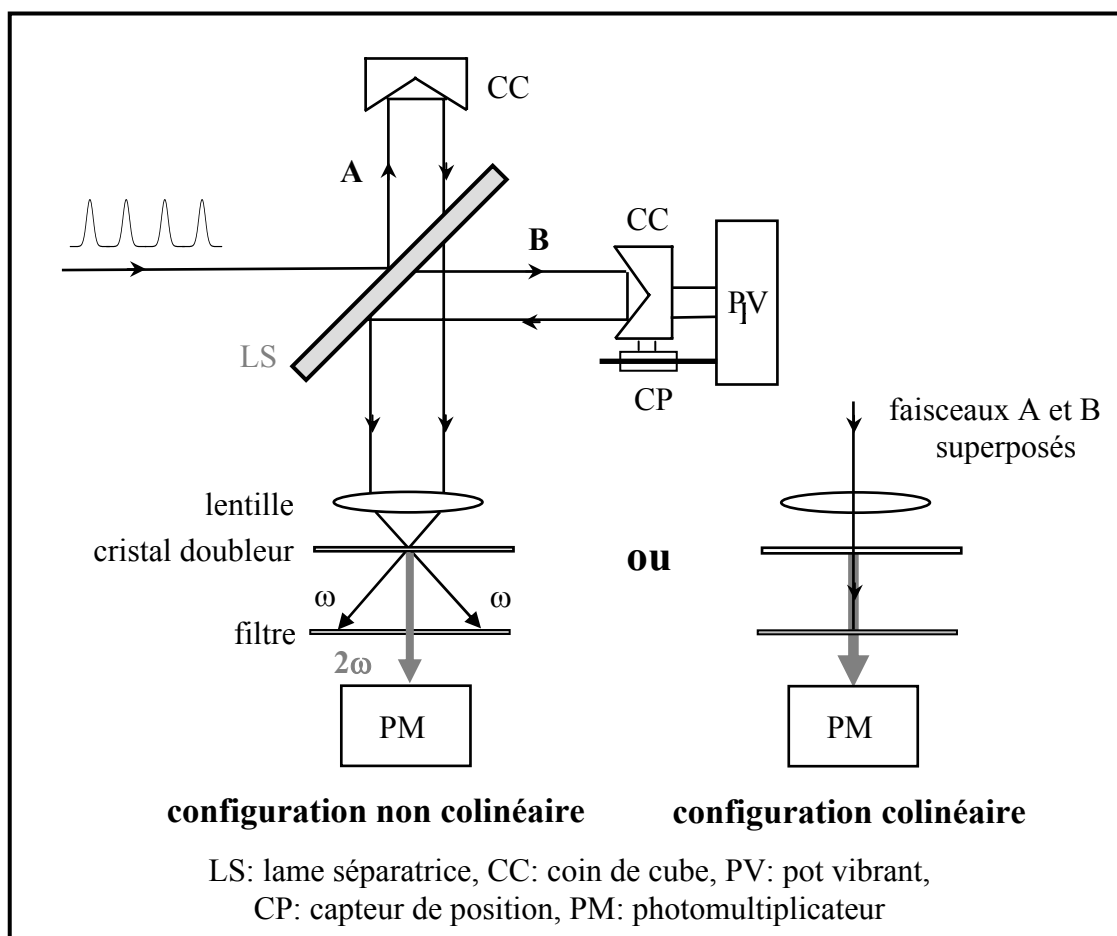


Figure II.3.1 : Schéma de principe de l'autocorrélation optique par génération du second harmonique non colinéaire ou colinéaire.

En ce qui concerne l'autocorrélateur par génération de second harmonique colinéaire, le principe de fonctionnement est exactement le même. Il suffit uniquement de translater latéralement les coins de cube afin que les deux faisceaux soient parfaitement superposés avant la lentille. Le second harmonique est dans ce cas généré selon les interférences constructives réalisées par les deux trains d'impulsions et suivant leur direction de propagation.

Autocorrélation optique par génération de second harmonique non colinéaire ou autocorrélation en intensité.

Dans le cas d'une autocorrélation optique par génération du second harmonique non colinéaire, l'onde de second harmonique est générée à chaque intersection de deux impulsions à l'intérieur du cristal non linéaire doubleur de fréquence. La fonction d'autocorrélation est

donc construite point par point, chaque point correspondant à une valeur du décalage temporel τ . La fonction d'autocorrélation (II.3.1) s'écrit dans ce cas [Diels 1985] :

$$g_{NC}(\tau) = 1 + 2 \frac{\int I(t)I(t+\tau)dt}{\int I^2(t)dt}, \quad (II.3.2)$$

avec $I(t) = |E(t)|^2 = \xi^2(t)$.

L'intensité de l'onde de seconde harmonique générée $I_{SH} = \int I(t)I(t+\tau)dt$ et détectée par le photomultiplicateur est directement proportionnelle à cette fonction d'autocorrélation.

Ainsi, par mesure directe de la largeur à mi-hauteur $\Delta\tau_{ac}$ de la fonction d'autocorrélation, on peut facilement déduire la durée $\Delta\tau$ de l'impulsion, ces deux grandeurs étant reliées par une constante : $\Lambda = \Delta\tau_{ac} / \Delta\tau$ (tableau II.3.1).

$\xi(t)$	$g_{NC}(\tau)$	$\Lambda = \Delta\tau_{ac} / \Delta\tau$
$\exp(-t^2)$	$\exp\left(-\frac{\tau^2}{2}\right)$	1,414
$\text{sech}^2(t)$	$3 \frac{(\tau \cosh \tau - \sinh \tau)}{\sinh^3 \tau}$	1,543

Tableau II.3.1 : forme de la fonction d'autocorrélation en intensité et valeur des constantes Λ en fonction de la forme considérée pour l'impulsion laser.

Ce type d'autocorrélateur permet donc une estimation relativement simple de la durée des impulsions. Cependant la fonction d'autocorrélation non colinéaire est symétrique et ne contient aucune information sur la phase. Par conséquent, les éventuelles distorsions ou dissymétries de l'impulsions ainsi que les effets de dérive de fréquence passent dans ce cas totalement inaperçus. Pour obtenir plus d'informations, il est nécessaire d'employer la configuration colinéaire de l'autocorrélateur ou autocorrélateur interférométrique.

Autocorrélation optique par génération de second harmonique colinéaire ou autocorrélation interférométrique.

Dans le cas d'une autocorrélation optique par génération du second harmonique colinéaire, les deux trains d'impulsions incidents dans le cristal non linéaire sont superposés

spatialement et donc interfèrent. Ainsi, la génération d'onde de seconde harmonique s'effectue ici pour chaque interférence constructive.

La fonction d'autocorrélation (II.3.1) s'écrit dans ce cas [Diels 1985] :

$$g_C(\tau) = 1 + \frac{2 \int E^3(t)E(t+\tau)dt + 2 \int E(t)E^3(t+\tau)dt + 3 \int E^2(t)E^2(t+\tau)dt}{\int E^4(t)dt}. \quad (\text{II.3.3})$$

L'expression de la fonction d'autocorrélation est alors plus complexe que dans le cas non colinéaire. Pour une impulsion sans dérive de fréquence, la fonction d'autocorrélation est caractérisée par un rapport 1/8 entre l'amplitude de l'enveloppe inférieure et l'amplitude totale. Par ailleurs, elle a l'avantage de déceler les processus de dérive de fréquence, ceux-ci laissant des signatures caractéristiques dans la fonction d'autocorrélation : déformation et non respect du rapport 1/8 (figure II.3.2).

Pour d'illustrer ces caractéristiques, considérons le cas de l'impulsion de type gaussienne présentant une dérive de fréquence linéaire:

$$E(t) = \exp\left(-\frac{t^2}{2\Delta\tau^2}\right) \exp\left[-i\left(\omega_0 t + \frac{At^2}{\Delta\tau^2}\right)\right], \quad (\text{II.3.4})$$

où A est proportionnel à la dispersion de la vitesse de groupe φ'' .

Il a été démontré que la fonction d'autocorrélation interférométrique s'exprimait dans ce cas sous la forme suivante [Sala 1980]:

$$g_C(\tau) = 1 + 2 \exp\left(-\frac{\tau^2}{2\Delta\tau^2}\right) + 4 \exp\left(-\frac{(3+4A^2)\tau^2}{8\Delta\tau^2}\right) \cos \frac{A^2\tau^2}{2\Delta\tau^2} \cos \omega_0\tau \\ + \exp\left(-\frac{(1+4A^2)\tau^2}{2\Delta\tau^2}\right) \cos 2\omega_0\tau. \quad (\text{II.3.5})$$

La figure (II.3.2) montre l'allure de la fonction interférométrique dans le cas d'une impulsion sans dérive de fréquence et pour une impulsion présentant une dérive de fréquence linéaire.

Un effet de dérive de fréquence apparaît donc nettement dans la fonction d'autocorrélation. La configuration interférométrique de l'autocorrélateur optique semble donc appropriée pour observer les effets de la dispersion de la vitesse de groupe introduite lors du passage des

impulsions laser à travers nos objectifs de microscope et ainsi de compenser efficacement ces effets.

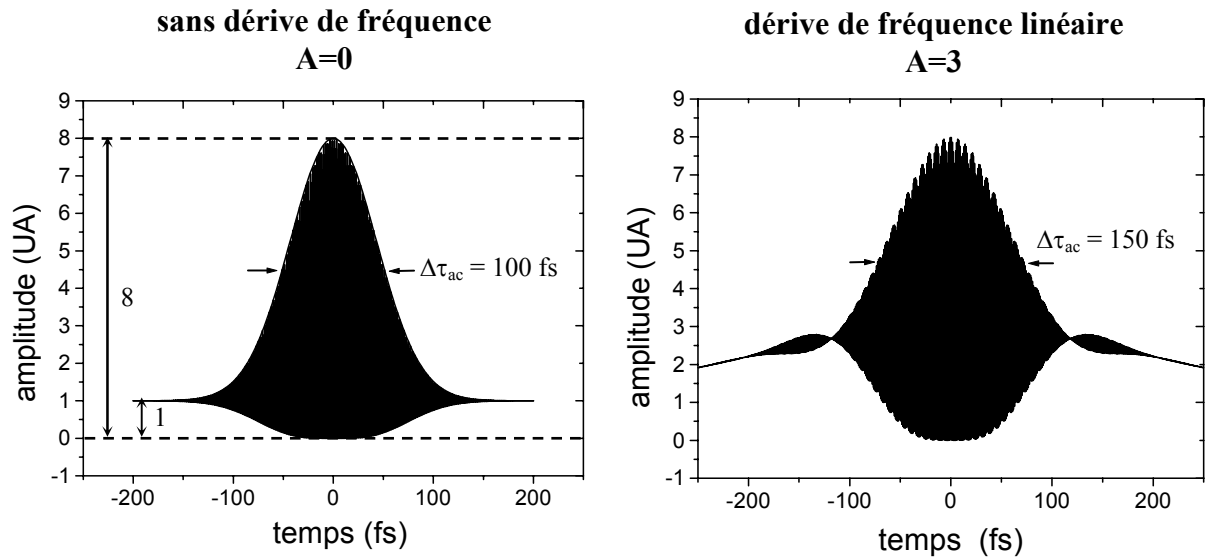


Figure II.3.2: formes caractéristiques de la fonction d'autocorrélation interférométrique pour une impulsion de type gaussienne avec ou sans dérive de fréquence (la valeur $A=3$ a été choisie de manière arbitraire).

Le tableau II.3.2 contient les expressions analytiques décrivant le profil des enveloppes supérieures et inférieures de la fonction d'autocorrélation interférométrique en fonction du modèle d'impulsion choisi, ainsi que les valeurs des constantes $\Lambda = \Delta\tau_{ac}/\Delta\tau$ à appliquer pour la détermination de la durée des impulsions. $\Delta\tau_{ac}$ sera, dans le cas de l'autocorrélation interférométrique, la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe supérieure de la fonction.

$\xi(t)$	$g^{\pm}(\tau)$	$\Lambda = \Delta\tau_{ac}/\Delta\tau$
$\exp-t^2$	$1 + 3\exp\left(-\frac{\tau^2}{2}\right) \pm 4\exp\left(-\frac{3\tau^2}{8}\right)$	1,533
$\text{sech}^2(t)$	$1 + 9\frac{(\tau \cosh \tau - \sinh \tau)}{\sinh^3 \tau} \pm \frac{3(\sinh 2\tau - 2\tau)}{\sinh^3 \tau}$	1,696

Tableau II.3.2 : équations des enveloppes de la fonction d'autocorrélation interférométrique et valeur des constantes Λ en fonction de la forme considérée pour l'impulsion laser.

$g^+(\tau)$ correspond à l'expression de l'enveloppe supérieure de la fonction d'autocorrélation, $g^-(\tau)$ à son enveloppe inférieure.

II.3.1.2. Mesure de la durée des impulsions; influence de la dispersion de la vitesse de groupe introduite par un objectif de microscope.

Les mesures de durée des impulsions laser ont été effectuées principalement à la longueur d'onde $\lambda_0 = 800$ nm, longueur d'onde pour laquelle est taillé notre cristal de BBO pour un doublage de fréquence optimal. Avant chaque mesure, un ajustement des réglages du système de prismes présent dans la cavité laser est effectué de manière à obtenir un spectre le plus large possible.

Le spectre des impulsions générées par le laser dans ces conditions est représenté sur la figure (II.3.3-a). Il a été mesuré au moyen d'un spectromètre à fibre PC 2000 (Ocean Optics).

La figure (II.3.3-b) montre la fonction d'autocorrélation en intensité expérimentale correspondante. L'ajustement des courbes théoriques de profil gaussien ou en sécante hyperbolique au carré avec la fonction expérimentale montre que les deux modèles peuvent convenir. Les valeurs de la durée des impulsions en sortie du laser à la longueur d'onde $\lambda_0 = 800$ nm sont regroupées dans le tableau II.3.3. Considérant les valeurs des produits $\Delta\nu \cdot \Delta\tau$, la durée des impulsions produites par l'oscillateur est relativement proche de la limite imposée par la transformée de Fourier.

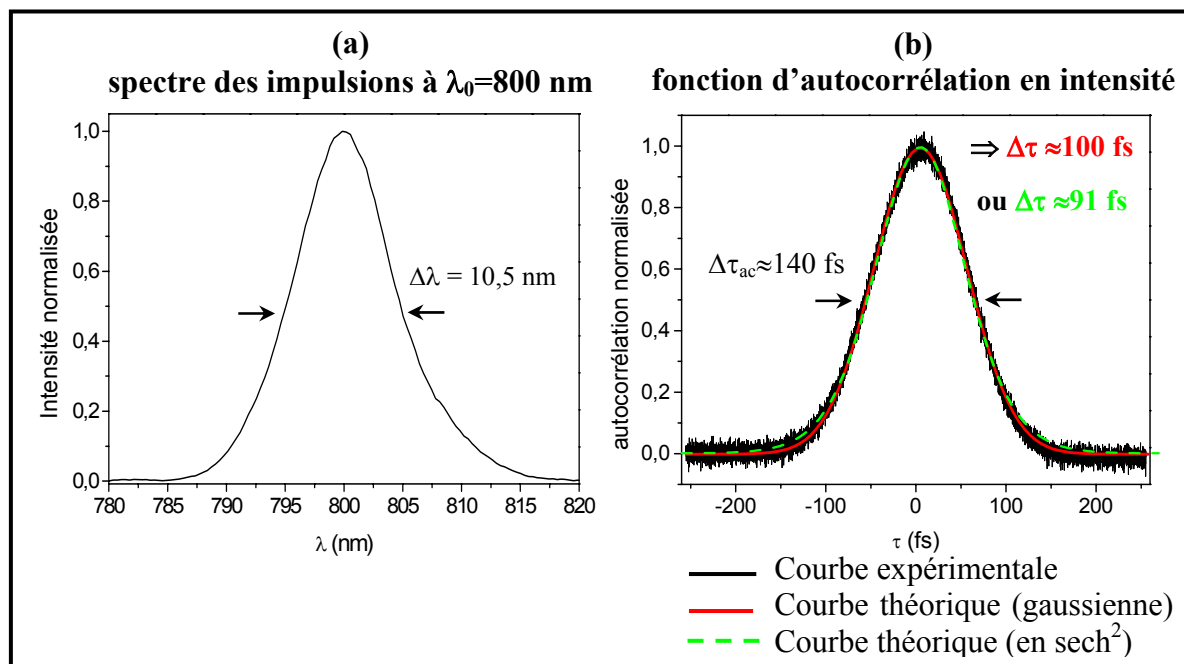


Figure II.3.3: Spectre des impulsions laser et fonction d'autocorrélation en intensité expérimentaux. L'ajustement des fonction d'autocorrélation théoriques de profil gaussien ou en sécante hyperbolique au carré avec la fonction expérimentale montre que les deux modèles peuvent convenir.

$\xi(t)$	$\Delta\tau$ (fs)	$\Delta\nu.\Delta\tau$	K
$\exp(-t^2)$	100	0,492	0,441
$\text{sech}^2(t)$	91	0,443	0,315

Tableau II.3.3 : valeurs expérimentales de la durée des impulsions en sortie du laser pour la longueur d'onde $\lambda=800$ nm en fonction du profil considéré pour l'impulsion, et valeurs expérimentales et théoriques (limite de la transformée de Fourier K) du produit $\Delta\nu\Delta\tau$.

Nous avons par ailleurs vérifié expérimentalement qu'il était possible de maintenir la durée des impulsions à environ 90-100 fs sur toute la gamme d'accordabilité en longueur d'onde du laser en optimisant uniquement le réglage des prismes intra-cavité à chaque changement de la longueur d'onde centrale d'émission.

Afin d'observer les effets de la dispersion de la vitesse de groupe, la mesure de la durée des impulsions après la traversée de nos objectifs de microscope a été effectuée par autocorrélation interférométrique. À titre de vérification et de validation de notre dispositif, la fonction d'autocorrélation a tout d'abord été enregistrée en sortie du laser dans des conditions identiques à celles utilisées en autocorrélation en intensité.

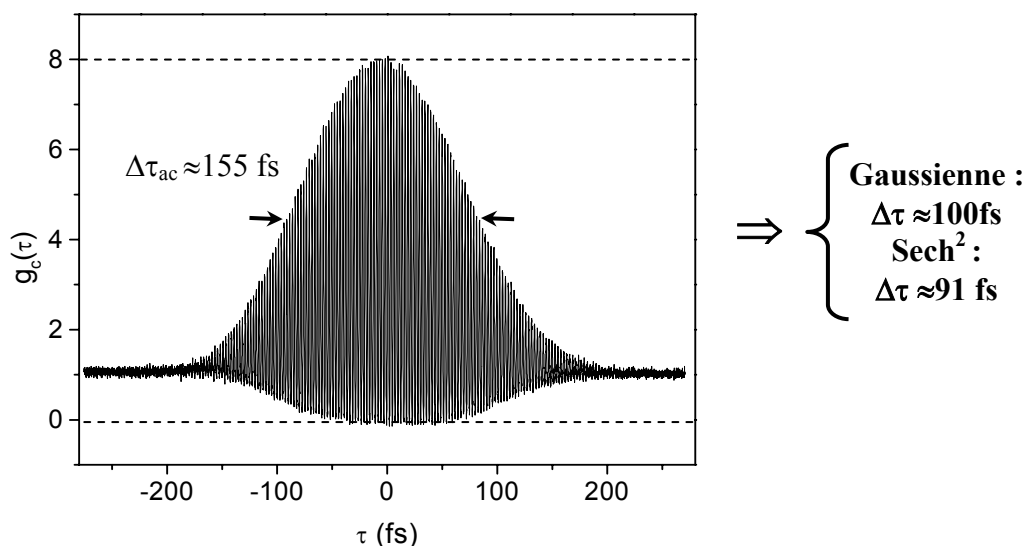


Figure II.3.4: fonction d'autocorrélation interférométrique expérimentale obtenue en sortie du laser (les franges ne sont pas résolues en raison de problèmes d'échantillonnage de l'oscilloscope)

La durée moyenne des impulsions mesurée de cette manière est égale à environ 90-100 fs, résultat en accord avec celui obtenu en autocorrélation en intensité. On constate ici que le rapport caractéristique 1/8 entre l'amplitude de l'enveloppe inférieure et l'amplitude totale de

la courbe est vérifié, confirmant le fait qu'en sortie du laser, l'impulsion ne présente pas ou très peu de dérive de fréquence.

Pour la mesure de la durée des impulsions en sortie de nos objectifs de microscope, la lentille de l'autocorrélateur est remplacée par l'objectif considéré. Un second objectif est placé entre le cristal de BBO et le photomultiplicateur de manière à collecter et collimater l'onde de seconde harmonique générée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (II.3.4).

	Objectif	Distance de travail (mm)	$\Delta\tau_{ac}$ mesuré (fs)	$\Delta\tau$ (fs)
A	Zeiss LD Achroplan 40x, 0.6	1,8	170	100-111
B	Zeiss LD Achroplan 63x, 0.75	1,57	175	103-114
C	Zeiss Plan Apochromat 63x, 1.4 (immersion à huile)	0,09	Mesure impossible	

Tableau II.3.4: valeurs de la largeur des fonctions d'autocorrélation interférométriques en fonction de l'objectif traversé et durées des impulsions correspondantes (dans la colonne $\Delta\tau$, la première valeur correspond à un profil en $sech^2$, la deuxième est calculée pour un profil gaussien des impulsions).

* Cas des objectifs A et B

La dispersion de la vitesse de groupe introduite par les objectifs A et B n'est pas très importante. Les fonctions d'autocorrélation obtenues ne présentaient pas de déformations visibles, indiquant que la dérive de fréquence dans les impulsions en sortie de ces objectifs était négligeable. Il est utile de préciser qu'en raison de la divergence importante des faisceaux en sortie des objectifs, l'intensité du second harmonique généré dans le cristal de BBO est diminuée, les conditions d'accord de phase n'étant satisfaites que pour un faisceau dont la divergence n'excède pas un certain angle. Ici, la mesure des fonctions d'autocorrélation à travers les objectifs de microscope a été effectuée sans atténuation de l'énergie laser incidente et en utilisant la sensibilité la plus grande de nos détecteurs. Ainsi, le niveau de bruit dans les fonctions d'autocorrélation était relativement important, augmentant les valeurs des incertitudes de mesures. Nous considérerons donc, dans le cas de ces deux objectifs, que les effets de la dispersion de la vitesse de groupe est négligeable et ne nécessite pas de compensation.

*** Cas de l'objectif à immersion de grande ouverture numérique C**

L'objectif à immersion à huile (63x, 1,4) sera l'objectif le plus fréquemment utilisé lors de nos applications en microscopie de fluorescence par absorption à deux photons. Cependant, la très faible distance frontale de l'objectif, la très grande divergence des faisceaux en sortie et l'emploi d'huile à immersion rendent l'utilisation de l'autocorrélateur par génération de second harmonique impossible. Il nous est donc nécessaire d'employer d'autres méthodes pour observer et quantifier les effets de la dispersion de la vitesse de groupe dans ce cas, d'autant plus que de précédentes études ont mis en évidence un élargissement conséquent des impulsions lors de l'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique [Hänninen 1994]. Disposant momentanément de deux objectifs identiques, nous avons effectué le montage représenté sur la figure II.3.5.

Par ce moyen, nous avons mesuré une durée d'impulsion après la traversée de deux objectifs identiques de 210 fs pour une impulsion de type gaussien. En appliquant l'équation II.2.9, il est possible de calculer la dispersion de la vitesse de groupe ϕ'' introduite par le système composé des deux objectifs: $\phi'' = 6660 \text{ fs}^2$ soit $\phi'' = 3330 \text{ fs}^2$ pour un seul objectif.

En effectuant le calcul inverse, on obtient la valeur de la durée des impulsions en sortie d'un seul objectif: $\Delta\tau = 136 \text{ fs}$.

Les impulsions subiraient donc un élargissement d'environ 40% après traversée de notre objectif à immersion.

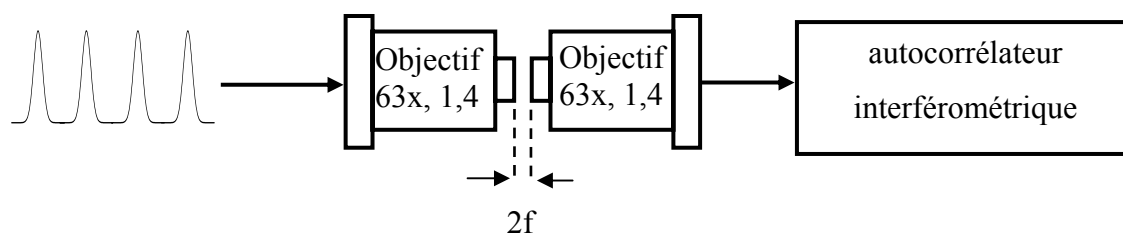


Figure II.3.5: dispositif expérimental pour l'évaluation de la dispersion de la vitesse de groupe introduite par l'objectif à immersion (63x, 1,4).

La mesure de la durée des impulsions par cette méthode indirecte, ne permet pas de visualiser et donc de compenser précisément les effets de la dispersion due à un seul objectif. Pour palier à ce problème, nous utiliserons un autre type d'autocorrélateur basé sur le processus d'absorption à deux photons.

II.3.2. Autocorrélation optique par absorption à deux photons dans une diode électroluminescente ou une photodiode.

II.3.2.1. Principe et caractéristiques.

L'autocorrélateur optique par absorption à deux photons est une technique récente proposée pour la caractérisation d'impulsions femtosecondes au foyer d'objectifs de microscope de grande ouverture numérique [Müller 1995, Ranka 1997, Millard 1999]. Le principe est basé sur l'utilisation soit d'une diode électroluminescente non alimentée employée en guise de détecteur, soit d'une photodiode non polarisée. En effet, des études préliminaires ont montré que, si l'on focalise des impulsions femtosecondes sur l'un de ces composants, celui-ci délivre une tension qui varie de manière quadratique avec l'énergie des impulsions incidentes. Le processus à l'origine de cette réponse est l'absorption à deux photons se produisant dans le semi-conducteur du composant. Le principe est le suivant: lors de l'excitation du semi-conducteur par des impulsions femtosecondes, une absorption à deux photons peut avoir lieu. Cette absorption a pour conséquence le passage d'électrons de la bande de valence vers la bande de conduction et génère ainsi un photocourant.

Le choix du matériau constituant composant est alors crucial: la bande d'énergie séparant les bandes de valence et de conduction doit en effet être suffisamment large pour empêcher toute absorption linéaire des photons incidents. Nous utiliserons dans le cadre de notre étude une photodiode G1117 (Hamamatsu) de surface sensible relativement large (5,6 mm x 5,6 mm) caractérisée par une réponse spectrale (pour une absorption à un photon) entre 300 et 680 nm (maximum à 660 nm). Cette photodiode réagit donc, suite à une absorption à deux photons, à des longueurs d'onde allant de 600 à 1320 nm, couvrant l'entière gamme d'accordabilité de notre laser femtoseconde à saphir dopé au titane.

Le principe de fonctionnement de l'autocorrélateur utilisant une photodiode est exactement le même que celui de l'autocorrélateur par génération de second harmonique colinéaire dans lequel on a remplacé le cristal non linéaire et le photomultiplicateur par la photodiode. La figure II.3.6 présente le dispositif expérimental que nous avons développé pour la mesure de la durée des impulsions au point de focalisation de notre objectif de grande ouverture numérique.

Ce nouveau type d'autocorrélateur offre de nombreux avantages: tout d'abord, les photodiodes utilisées sont très peu onéreuses comparé au coût d'un cristal non linéaire et d'un

photomultiplicateur. D'autre part, les différentes contraintes relatives à l'utilisation d'un cristal non linéaire sont éliminées : plus de condition d'accord de phase à respecter. L'autocorrélateur utilisant une photodiode répond à une gamme étendue de longueurs d'onde. Le dispositif est donc compact et très simple à mettre en œuvre, ne nécessitant aucun alignement précis.

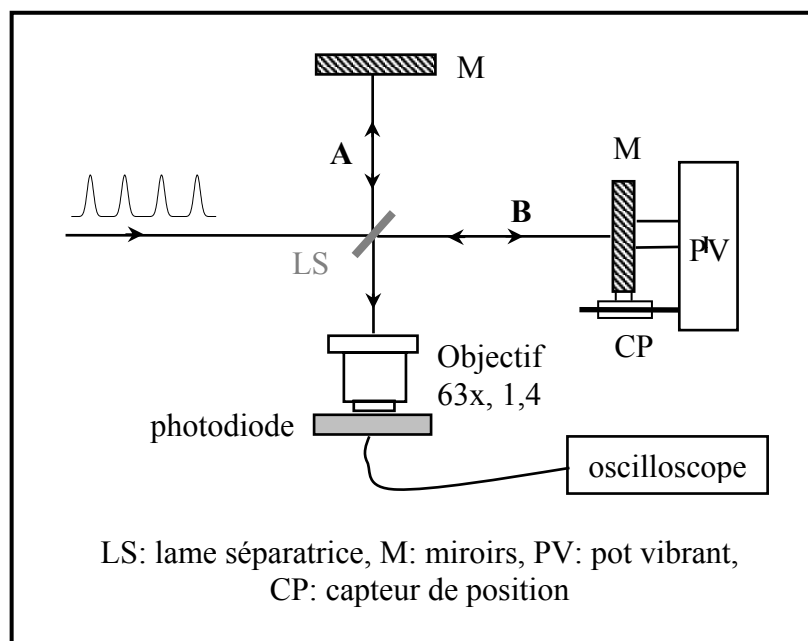


Figure II.3.6: schéma de principe de l'autocorrélateur interférométrique basé sur l'utilisation d'une photodiode.

II.3.2.2. Observation et compensation des effets de la vitesse de groupe introduite par un objectif de grande ouverture numérique.

Afin d'être en mesure de travailler avec un objectif de grande ouverture numérique, la fenêtre de protection de la photodiode a été supprimée de manière à pouvoir approcher l'objectif le plus près possible de sa surface sensible.

La figure II.2.7 montre la fonction d'autocorrélation interférométrique enregistrée, suivant le montage expérimental représenté sur la figure II.3.6. Nous préciserons que ce système d'autocorrélation basé sur une photodiode est particulièrement sensible. En effet, les fonctions d'autocorrélation ont été obtenues en n'utilisant que 10% de l'énergie délivrée par le laser.

Cette figure montre clairement les effets de la vitesse de groupe introduite par l'objectif : distorsion de l'enveloppe de la fonction d'autocorrélation, non respect du rapport caractéristique $1/8$ et élargissement des impulsions. En sortie de l'objectif, la durée des

impulsions est estimée à 130-140 fs selon le modèle utilisé pour décrire la forme des impulsions, valeur en bon accord avec l'estimation effectuée par autocorrélation interférométrique par génération du second harmonique.

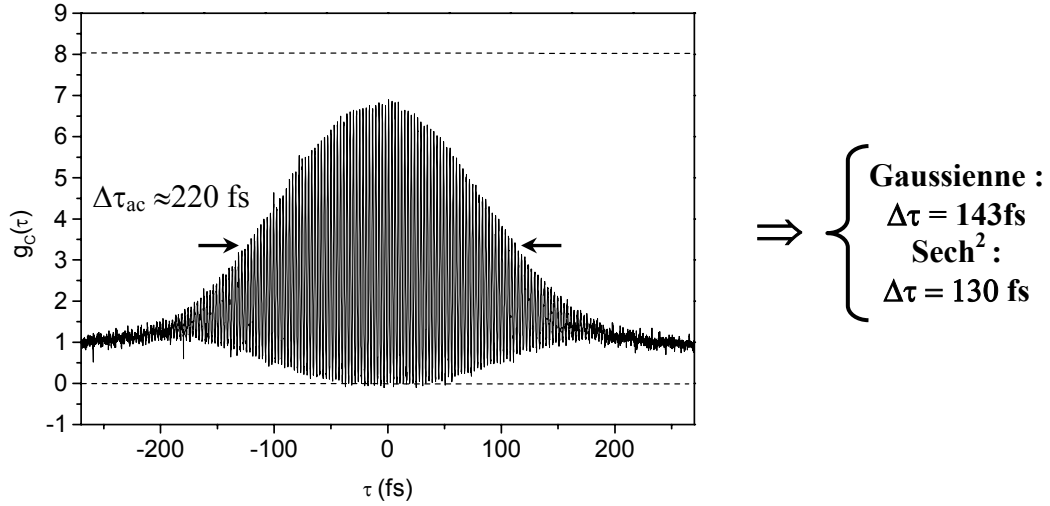


Figure II.3.7 : autocorrélation interférométrique caractérisant les impulsions en sortie de l'objectif à immersion (63x, 1,4).

Il s'agit maintenant de compenser cet effet de dispersion. Pour cela, nous avons intégré dans notre montage le système de prismes présenté au paragraphe II.2.2. Les réglages de ce système (distance entre les prismes et épaisseur de verre traversé) sont optimisés de manière à réduire la durée des impulsions et éliminer les effets de dérive de fréquence (figure II.3.8).

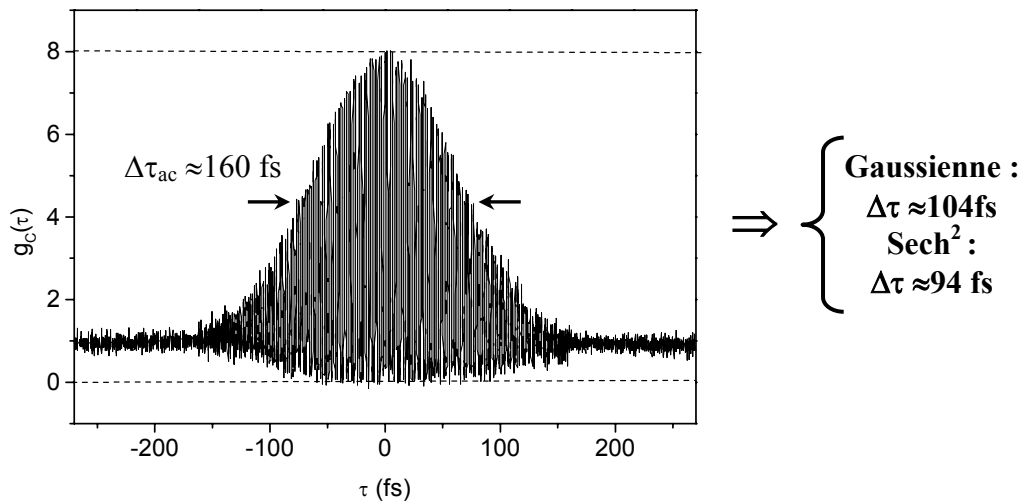


Figure II.3. 8 : fonction d'autocorrélation enregistrée en sortie de l'objectif à immersion (63x, 1,4) après compensation de la dispersion de la vitesse de groupe.

Grâce à cette précompensation de la dispersion de la vitesse de groupe par le système de prisme, il est possible de maintenir la durée des impulsions à environ 90-100 fs au foyer de

notre objectif de grande ouverture numérique. Nous précisons que, pour une bonne compensation de cette dispersion, l'optimisation des réglages des prismes devra être effectué à chaque changement de la longueur d'onde centrale d'émission du laser.

II.3.3. Conclusions

Les différents dispositifs d'autocorrélation optique que nous avons développés constituent un ensemble complet pour la mesure et le contrôle de la durée des impulsions femtosecondes délivrées par l'oscillateur à saphir dopé au titane. Nous sommes désormais en mesure d'observer et de compenser efficacement la dispersion de la vitesse de groupe introduite par nos objectifs de microscope. Cette caractérisation préliminaire des impulsions au point de focalisation des objectifs de microscope est primordiale en microscopie de fluorescence par absorption à deux photons. En effet, l'intensité de fluorescence émise dans ce cas est inversement proportionnelle au carré de la durée des impulsions. Un élargissement des impulsions de 100 à 140 nm correspondrait à une perte de 50% dans l'intensité de fluorescence émise. Le système de précompensation de la dispersion de la vitesse de groupe à base de prismes sera donc inclus dans notre montage pour la plupart de nos applications.

Chapitre III

Mise en place et applications de la microscopie de corrélation de fluorescence sous EDP

Ce chapitre concerne la première méthode d'analyse dynamique de l'émission de fluorescence développée dans le cadre de notre projet de microscopie de fluorescence par excitation à deux photons (EDP): la microscopie de corrélation de fluorescence (MCF). La technique de MCF est de plus en plus employée depuis la commercialisation de systèmes complets qui intègrent un microscope confocal et le matériel électronique nécessaire aux acquisitions de courbes de corrélation (par exemple : le système Confocor, Zeiss). Ces dispositifs, caractérisés par une très grande facilité d'utilisation, deviennent un outil intéressant pour les industriels (biologie, pharmacologie, ...) dont les besoins sont d'effectuer des mesures fréquentes et routinières. Cependant, le domaine d'applications de la MCF n'a pas encore été entièrement exploité et ces systèmes commerciaux ne sont pas encore adaptés à la microscopie biphotonique. D'autre part, ces équipements, en plus d'être très coûteux, ont le désavantage d'être des systèmes « fermés », n'autorisant aucune possibilité d'évolution. Dans le cadre de notre projet, nous avons élaboré nous-mêmes notre système de MCF sous EDP à partir d'un microscope classique et de divers éléments électroniques appropriés afin de disposer d'un montage évolutif qui pourra être transformé et adapté en fonction des applications. Notre système nous permet par ailleurs de mettre à profit les divers avantages de l'EDP pour l'étude de milieux biologiques.

Nous présenterons dans ce chapitre notre technique de MCF sous EDP, appliquée principalement à l'étude du processus de diffusion moléculaire. Une première partie décrira le système expérimental développé pour la détermination des coefficients de diffusion. Des études préliminaires réalisées *in-vitro* seront présentées afin de valider et de montrer les performances de notre technique. Dans ce but, nous exposerons les résultats obtenus en solution pour diverses molécules fluorescentes utilisées couramment comme sondes biologiques telles que la fluorescéine, le FITC-dextran et la GFP (Green Fluorescent protein). Dans l'objectif de montrer les possibilités d'application de cette technique en milieu biologique vivant, la deuxième partie de ce chapitre présentera une application originale et innovante de la MCF sous EDP à la caractérisation des mécanismes de diffusion moléculaire au sein de biofilms bactériens.

Nous terminerons ce chapitre par l'exposé des perspectives futures autour de ce montage et des projets d'évolution envisagés à court terme.

III.1. Dispositif expérimental de microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons.

La première partie de ce paragraphe présentera le montage expérimental mis en place pour les études de microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons. Une deuxième partie concernera plus précisément l'acquisition, le calcul des fonctions d'autocorrélation et le traitement des données.

III.1.1. Montage expérimental.

Le montage expérimental réalisé pour les études de microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons est représenté sur la figure III.1.1.

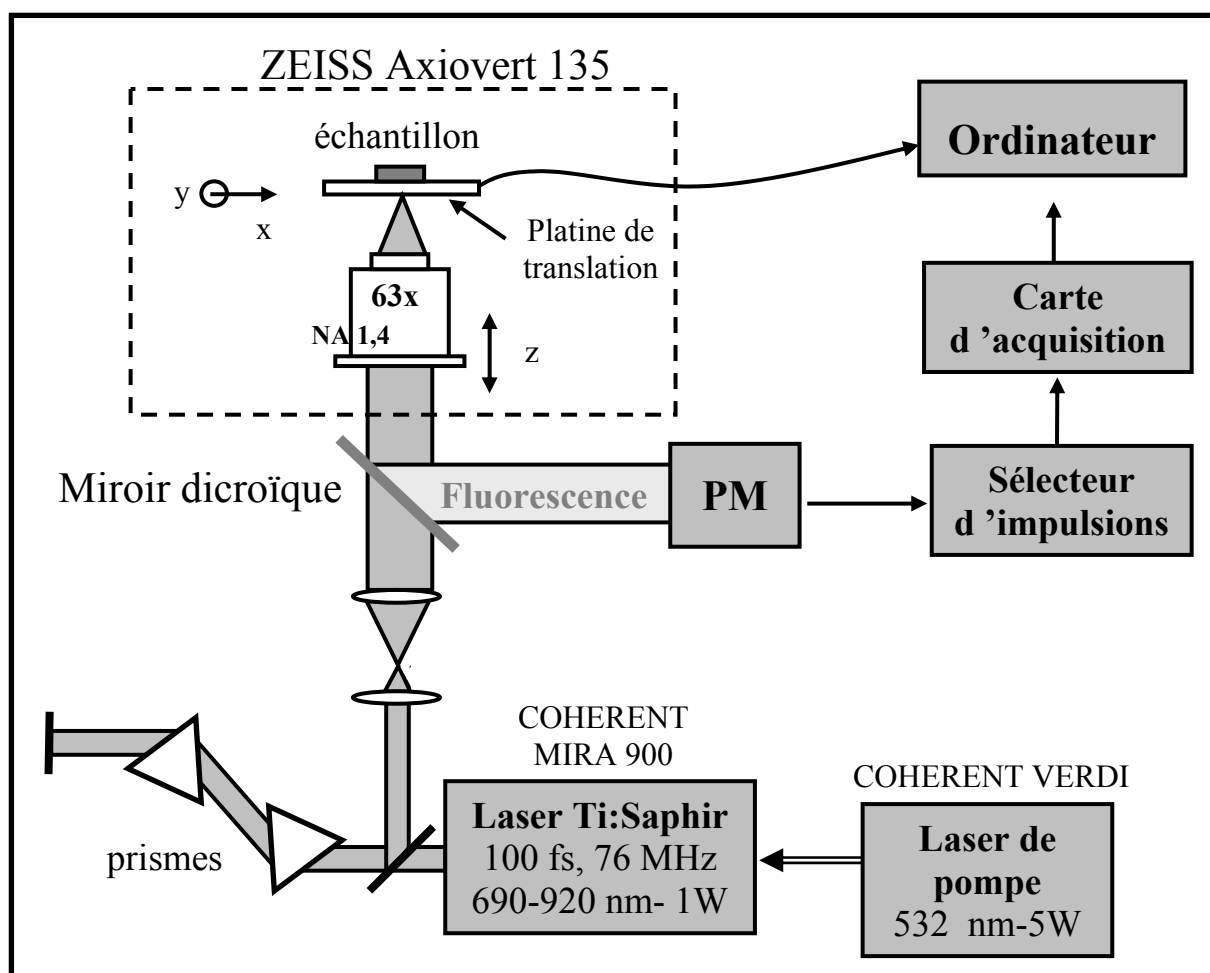


Figure III.1.1: schéma du montage expérimental de microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons.

Ce montage est basé sur l'utilisation du système d'excitation de la fluorescence présenté dans le chapitre II, composé d'un laser de pompe (Coherent Verdi), d'un laser à saphir dopé au titane (Coherent MIRA 900) et du système de prismes pour la précompensation de la dispersion de la vitesse de groupe introduite par les objectifs de microscope.

Le faisceau laser émis est élargi spatialement au moyen d'un télescope (association de deux lentilles) afin que la section du faisceau devienne suffisamment large pour recouvrir totalement la pupille d'entrée des objectifs de microscope. Ce faisceau élargi entre dans un microscope inversé de type Zeiss Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne) suivant le trajet normal d'épifluorescence (fluorescence collectée par l'objectif qui sert à l'excitation) modifié pour les besoins de notre application (élimination des lentilles et filtres requis lors de l'utilisation d'une lampe UV). Le faisceau est ensuite focalisé par l'objectif de microscope à immersion à huile (Zeiss Plan Apochromat) de grandissement 63x et de grande ouverture numérique (1,4) définissant un volume d'excitation aussi petit que possible.

Notre microscope est équipé d'une platine de translation (x,y) actionnée par des moteurs pas à pas (SCAN 100x100, Märzhäuser, Allemagne) et reliée à un contrôleur (Multicontrol 2000, ITK, Lahnau-Allemagne) permettant, par le biais d'une connexion par le port série (RS232), le pilotage par ordinateur des déplacements latéraux fins des échantillons (pas de translation minimal de 0,125 μm , déplacement maximal : 10 cm). Le déplacement en z de l'objectif de microscope est piloté par le même type de moteur permettant une focalisation contrôlée plus ou moins en profondeur dans l'échantillon. Les déplacements de l'objectif en z seront ici limités par la distance frontale de l'objectif, dans notre cas : 0,09 mm.

La fluorescence émise par l'échantillon placé sur la platine du microscope est collectée par le même objectif qui sert à l'excitation. L'utilisation d'une grande ouverture numérique est dans ce cas aussi très importante. En effet, l'efficacité de collection de la fluorescence est d'autant plus élevée que l'ouverture numérique est grande. Par exemple, un objectif d'ouverture numérique 1,4 collecte 32% de la fluorescence totale émise alors qu'un objectif d'ouverture numérique 0,6 n'en collecterait que 10%.

La fluorescence est séparée du faisceau laser excitateur au moyen d'un miroir dichroïque (Cold mirror, Coherent) caractérisé, pour une incidence à 45°, par une transmission moyenne dans 85 % de la gamme de longueur d'onde 750 nm -1000 nm et d'une

réflexion de 95 % en moyenne pour la gamme de longueur d'onde 400 nm -700 nm (figure III.1.2).

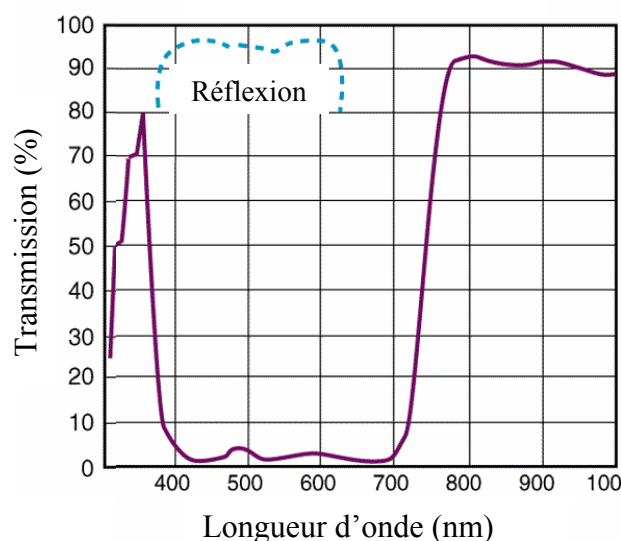


Figure III.1.2 : Courbes de transmission et de réflexion du miroir dichroïque «Cold Mirror»(catalogue Coherent).

Le signal de fluorescence est détecté par un photomultiplicateur rapide (R7205-01, Hamamatsu) fonctionnant en régime de comptage de photons. Il est caractérisé par un fort gain (gain de 10^7 sous une tension d'alimentation de 1000 V), une largeur d'impulsion d'environ 2 ns pour chaque photon reçu (impulsion de type NIM) et un courant d'obscurité très faible (3 nA) résultant en un bruit d'obscurité maximal de 30 coups/s. Ce photomultiplicateur (PM) a par ailleurs été choisi en raison de sa réponse spectrale (de 300 nm à 650 nm, efficacité quantique maximale : ~25% à 420 nm, figure III.1.3) permettant la détection de la fluorescence de la plupart des chromophores. De plus, sa sensibilité de détection étant quasiment nulle dans l'infrarouge, il permet la détection exclusive de la fluorescence sans perturbation par le faisceau laser excitateur. Les éventuels résidus d'infrarouge détectés sont alors éliminés au moyen de filtres passe-bas, caractérisés par environ 80 % de transmission pour les longueurs d'onde inférieures à 700 nm (Short-pass filters, Coherent).

Le PM est relié à un sélecteur d'impulsions électroniques (TC 454 Quad CF Discriminator, Oxford Instruments Inc), adapté à l'utilisation de détecteurs ultra-rapides. Ce sélecteur d'impulsions sert à trier les impulsions NIM émises par le PM selon leur amplitude. Par réglage d'un seuil en tension, toutes les impulsions dont l'amplitude est inférieure à ce seuil,

correspondant au bruit, sont éliminées. D'un point de vue pratique, la valeur de ce seuil a été réglée de manière à minimiser le bruit d'obscurité du PM (taux de comptage < 20 coups/s).

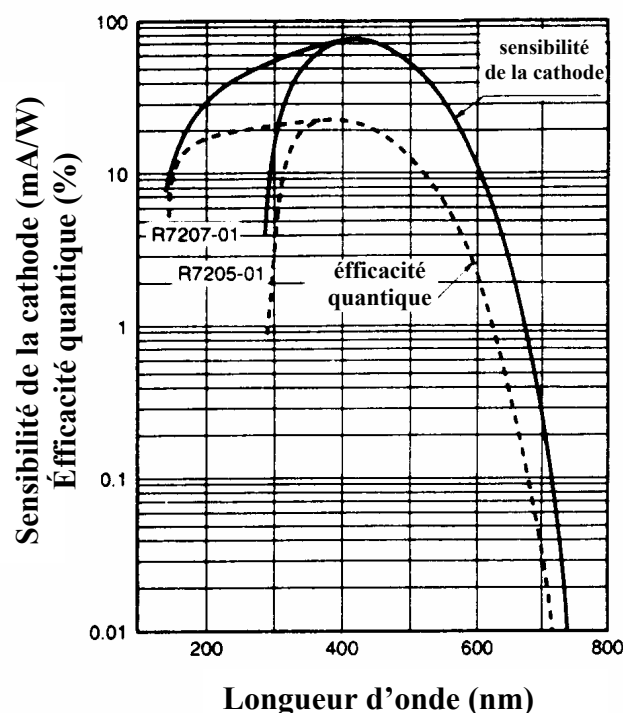


Figure III.1.3 : réponse spectrale du photomultiplicateur Hamamatsu R7205-01.

Une carte d'acquisition (PCI-6602, National Instrument) reliée à l'ordinateur, permet ensuite le comptage des impulsions électroniques. Cette carte n'acceptant en signal d'entrée que des impulsions de type TTL, un boîtier électronique a été conçu (atelier d'électronique du laboratoire de Photophysique Moléculaire) de manière à transformer les impulsions NIM issues du système PM + sélecteur d'impulsions. Le comptage des impulsions se fait grâce à une porte électronique dont nous contrôlons les divers paramètres, à savoir la fréquence et la largeur. Nous utiliserons typiquement pour nos études en MCF des portes de quelques microsecondes de largeur et une fréquence de 20 MHz. La carte permet alors le comptage des impulsions TTL émises pendant la durée d'ouverture de la porte selon le procédé illustré sur la figure III.1.4. Le nombre d'impulsions détectées pendant la durée de chaque porte, correspondant au nombre de photons détectés par intervalle de temps, peut ainsi facilement être enregistré.

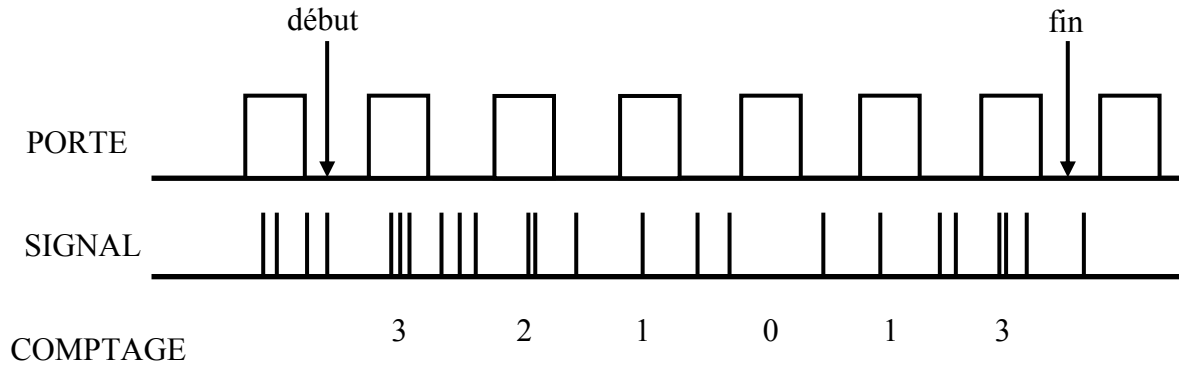


Figure III.1.4 : mode de comptage de la carte d'acquisition PCI-6602. Les impulsions émises (signal de fluorescence) sont comptées pendant la durée d'ouverture des portes temporelles et mémorisées dans un tableau.

III.1.2. Acquisition et traitement des données.

Les différents programmes informatiques servant à l'acquisition, au calcul des courbes de corrélation de fluorescence et au traitement des données ont été développés sous Microsoft Visual C++.

Une première étape consista en l'élaboration d'un programme d'acquisition des données, c'est-à-dire d'enregistrement du nombre de photons comptés par intervalle de temps par la carte d'acquisition. On dispose ainsi du signal $I_F(t)$ des fluctuations temporelles de l'intensité de fluorescence requis pour le calcul des courbes de corrélations.

Rappelons que l'expression de la fonction d'autocorrélation (chapitre I, paragraphe I.4):

$$g(\tau) = \frac{\int I_F(t) I_F(t + \tau) dt}{\int I_F^2(t) dt}. \quad (\text{III.1.1})$$

Le calcul des fonctions de corrélation de fluorescence s'effectue de manière discrète selon l'équation suivante :

$$g_{\text{exp}}(jT_p) = \frac{\left[N_p^{-1} \sum_{i=1}^{N_p} I_F(iT_p) I_F(iT_p + jT_p) \right]}{\left[N_p^{-1} \sum_{i=1}^{N_p} I_F(iT_p) \right]^2} \text{ avec } jT_p = \tau; (j=1,2,3,\dots) \quad (\text{III.1.2})$$

où N_p désigne le nombre total de portes temporelles utilisées pour l'acquisition, T_p la largeur temporelle de cette porte, $I_F(iT_p)$ le nombre de photons comptés dans la $i^{\text{ème}}$ porte de durée T_p .

Le décalage τ à appliquer pour le calcul de l'autocorrélation est alors dans ce cas proportionnel à la largeur de la porte (principe du calcul discret).

Le mode d'acquisition et de calcul des fonctions d'autocorrélation par notre programme s'effectue selon les étapes suivantes :

- sélection par l'utilisateur de la largeur de la porte temporelle T_p , du nombre total N_p de portes à utiliser et d'un nombre de cycles N_c . Lors de nos mesures, la largeur de la porte temporelle T_p sera typiquement de 1 à 10 μ s. Le choix de la durée de la porte temporelle est fonction du temps de diffusion des molécules étudiées : T_p doit toujours être largement inférieur au temps de diffusion. Plus précisément, des durées de 1 à 10 μ s permettront l'analyse de temps de diffusion variant de 100 μ s à plusieurs millisecondes. Les acquisitions seront effectuées sur un nombre total de portes variant de 1 million à 1,5 million correspondant à une durée d'acquisition totale de 1 à 15 s.

- Cycle n°1 :

- lancement de l'acquisition et enregistrement d'un vecteur $I_F(t)$ de 1 à 1,5 million de composantes contenant le nombre de photons détectés par intervalle de temps T_p .
- Calcul, à partir de ce vecteur de la fonction d'autocorrélation $g(\tau)$ conformément à l'équation III.1.2.

- Cycle n°2 :

- nouvelle acquisition d'un vecteur $I_F(t)$ dans les mêmes conditions que celles du cycle 1 et calcul d'une fonction d'autocorrélation $g'(\tau)$.
- Calcul de la fonction d'autocorrélation moyenne selon la formule :

$$g_{\text{moy}}(\tau) = \frac{N_c - 1}{N_c} \left[g(\tau) + \frac{1}{N_c - 1} g'(\tau) \right]. \quad (\text{III.1.3})$$

- Cycle n°3 à cycle n° N_c :

- remplacement de la fonction $g(\tau)$ par la fonction $g_{\text{moy}}(\tau)$ calculée lors du cycle précédent ($g(\tau) = g_{\text{moy}}(\tau)$).
- Répétition des étapes d'acquisition d'un vecteur $I_F(t)$, de calcul d'une fonction de corrélation $g'(\tau)$ et d'une fonction de corrélation moyenne suivant l'équation III.1.2.

Ce mode de calcul des fonctions d'autocorrélation par moyennages successifs n'est pas obligatoire. Il est en effet possible d'obtenir une fonction d'autocorrélation en un seul cycle suite à l'enregistrement d'un vecteur $I_F(t)$ sur une très grande durée d'acquisition. Cependant, le calcul de la fonction d'autocorrélation est dans ce cas très long et la visualisation du résultat n'est possible qu'une fois le calcul terminé. Les éventuels problèmes susceptibles de se produire au cours de l'acquisition et conduisant à une courbe de corrélation non satisfaisante ne seront donc remarqués qu'à la fin du processus acquisition-calcul. Notre programme permet d'éviter ces contraintes. En effet, l'enregistrement des vecteurs $I_F(t)$ contenant un nombre de composantes restreint permet un calcul rapide de la fonction d'autocorrélation. De plus, la visualisation de celle-ci à la fin de chaque cycle permet à l'utilisateur l'observation de l'évolution de la courbe de corrélation et l'interruption de l'acquisition en cas de problème.

Le nombre de cycle N_c à appliquer est choisi de manière à obtenir une courbe de corrélation de bonne qualité. Autrement dit, N_c doit être suffisamment grand pour que la dispersion des points expérimentaux composant la courbe ne soit pas trop importante. Le choix de la valeur de ce paramètre dépendra donc du nombre de photons comptés par intervalle de temps, c'est-à-dire de la largeur de la porte temporelle T_p et du rendement de fluorescence des molécules utilisées. La taille des molécules utilisées influencera aussi le choix de ce paramètre. En effet, une molécule de grande taille diffusera relativement lentement et le nombre de photons détecté par intervalle de temps sera plus élevé que dans le cas d'une petite molécule diffusant plus rapidement.

Le programme d'analyse des données que nous avons développé utilise alors la fonction de corrélation théorique de forme (chapitre I, paragraphe I.4):

$$g_{th}(\tau) = 1 + \frac{(1 - I_B/S)^2}{\sqrt{8N}} \left(1 + \frac{F \exp(-\tau/\tau_r)}{1 - F} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1/2} \quad (III.1.4)$$

Le rapport I_B/S est ici introduit afin de corriger une éventuelle diminution de l'amplitude de la courbe causée par la contribution du bruit de fond ($S = S_F + I_B$, S désignant le signal total détecté, S_F la contribution de la fluorescence et I_B le bruit de fond).

Pour les besoins de notre programme, l'équation III.1.4 sera utilisée sous forme discrète : la fonction est décomposée en N_c composantes telles que pour $j=1$ à N_c , $g_{th}(jT_p) = g_{th}(\tau=jT_p)$. Le programme ajuste la courbe d'autocorrélation théorique avec la courbe expérimentale, en

déterminant les paramètres N , F , τ_r , τ_D et ω_0/z_0 de l'équation III.1.4 qui minimisent le facteur χ^2 défini par :

$$\chi^2 = N_c^{-1} \sum_1^{N_c} [g_{\text{exp}}(jT_p) - g_{\text{th}}(jT_p)]^2. \quad (\text{III.1.5})$$

L'algorithme de minimisation utilisé est basé sur une méthode classique d'optimisation mathématique (méthode quasi newtonienne, [Minoux 1983]).

Le programme offre la possibilité de fixer initialement les différents paramètres. Entre autre, la mise à zéro de F et τ_r permet un traitement des données suivant un processus de diffusion uniquement.

Le processus de minimisation terminé, les composantes de la courbe de corrélation théorique $g_{\text{th}}(\tau)$ ainsi que les valeurs des différents paramètres sont mémorisés. Plusieurs critères sont alors utilisés afin de juger la fiabilité des résultats obtenus. Tout d'abord, la valeur de χ^2 doit aussi proche de 0 que possible. D'autre part, un calcul des résidus est effectué selon la relation suivante :

$$\text{res}(jT_p) = \frac{g_{\text{exp}}(jT_p) - g_{\text{th}}(jT_p)}{\sqrt{g_{\text{exp}}(jT_p)}}, \quad j = 1 \text{ à } N_c. \quad (\text{III.1.6})$$

La représentation des résidus en fonction du temps atteste alors de la fiabilité des résultats obtenus. Les résultats sont jugés satisfaisants si les résidus sont aléatoirement distribués autour de zéro.

III.2. Fluorophores utilisés pour les études en microscopie de corrélation de fluorescence.

Nous décrivons ici les différents fluorophores utilisés lors de notre étude en corrélation de fluorescence par excitation à deux photons. Nous indiquerons pour chacun d'eux leur caractéristiques d'absorption (monophotonique) et d'émission et nous préciserons l'intérêt de l'utilisation de ces molécules pour des application biologiques.

III.2.1. Billes de latex fluorescentes.

Les billes de latex fluorescentes sont des microsphères de polystyrènes (densité = $1,055 \text{ g/cm}^3$) dans lesquelles des molécules fluorescentes ont été introduites. Pour nos études, nous avons utilisé des billes de latex de charge de surface négative (groupements carboxylate

en surface) et de différentes tailles (diamètres variants de 28 à 110 nm) contenant toutes le même fluorophore (carboxylate-modified microspheres red fluorescent fournies par Molecular Probes). Nous noterons que la nature du fluorophore introduit dans les billes est inconnue (information non divulguée par le fabricant) et que nous disposons uniquement de certaines caractéristiques spectrales : spectre d'absorption large, avec un maximum à $\lambda_{\text{abs}} = 580$ nm et spectre d'émission de fluorescence centré sur $\lambda_{\text{ém}} = 605$ nm.

Leur taille moyenne donnée par le constructeur, a été déterminée en microscopie électronique avec un coefficient de variation du diamètre n'excédant pas 20%. Ces particules ont par ailleurs l'avantage de contenir un grand nombre de molécules fluorescentes (environ 200 et 7400 pour des billes de 28 nm et 110 nm respectivement). En raison de cet avantage, ce type de particules est très facile à détecter et est couramment employé comme sondes fluorescentes en milieu biologique (de nombreuses applications sont mentionnées sur le site <http://www.probes.com> : references for microspheres bibliography).

Dans le cadre de notre étude en microscopie de corrélation de fluorescence, les billes ont été utilisées en suspension dans de l'eau distillée. La préparation des échantillons a été effectuée par une dilution conséquente de la solution mère jusqu'à l'obtention d'une solution peu concentrée en billes (quelques billes / μm^3). Les solutions ont été filtrées puis soumises aux ultrasons avant chaque utilisation de manière à éliminer les éventuelles formations d'agrégats.

III.2.2. Molécules de FITC-dextran.

La structure de la molécule de Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)-dextran est représentée sur la figure III.2.1. La molécule de dextran est un polymère de glucose dont le poids moléculaire et les propriétés géométriques varient selon la longueur de la chaîne de polymères. En effet, les molécules de dextran, dont le poids moléculaire est inférieur à 2 000 Da (1 Da = 1 g/mole), sont caractérisées par une géométrie plutôt linéaire. Lorsque le poids moléculaire devient supérieur à 10 000 Da, leur géométrie devient globulaire et la molécule peut être assimilée à une sphère. Les molécules de dextran sont rendues fluorescentes suite à leur marquage par la molécule de FITC (fluorescéine isothiocyanate). Le FITC est fixé de manière aléatoire aux groupement hydroxyles du dextran, suivant la proportion de 0,003 à 0,02 moles de FITC par mole de glucose.

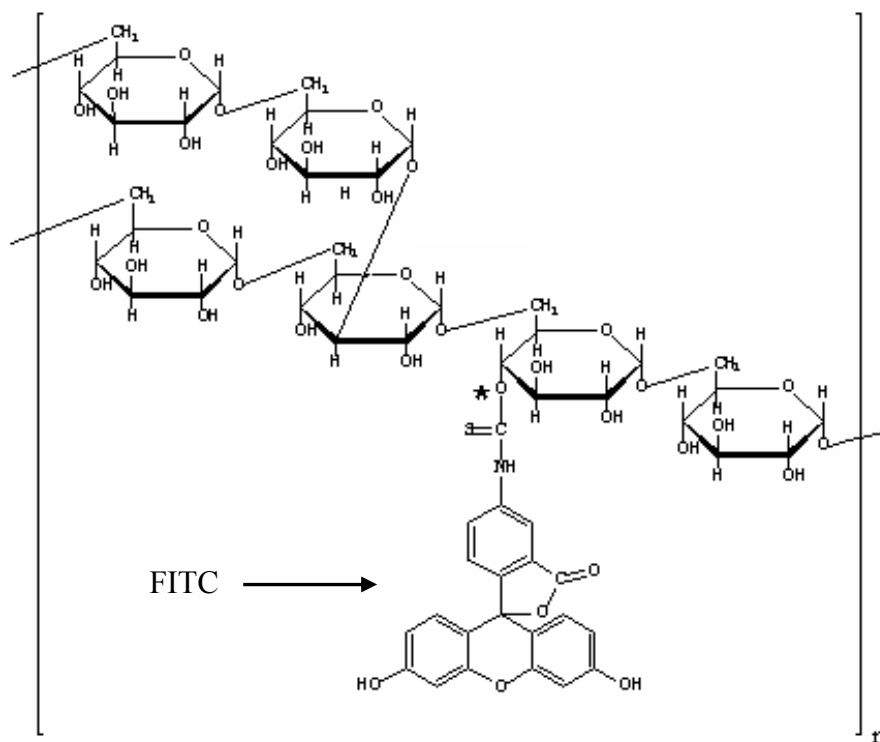


Figure III.2.2 : structure de la molécule de FITC-dextran.

Les molécules de FITC-dextran sont solubles dans l'eau à des concentrations inférieures ou égales à 25 mg/ml. Elles possèdent un maximum d'absorption monophotonique à 490 nm et un maximum d'émission de fluorescence à 520 nm (figure III.2.3). La fluorescence augmente avec le pH et est optimale pour un $\text{pH} \geq 8$ (le FITC a des propriétés spectroscopiques similaires à celles de la fluorescéine présentée au paragraphe III.2.4).

Nous utiliserons dans le cadre de notre étude en microscopie de corrélation de fluorescence des molécules de FITC-dextran (Sigma-Aldrich, Inc) de poids moléculaire variant de 20 000 à 150 000 Da. Dans cette gamme de poids moléculaire, les molécules ont une géométrie sphérique et leur rayon moyen, donné par le constructeur (déterminé en diffusion de la lumière) figure dans le tableau III.2.1.

Poids moléculaire (Da)	20 000	40 000	70 000	150 000
Rayon (nm)	3,3	4,5	6,0	8,5

Tableau III.2.1 : rayon des molécules de FITC-dextran donné par le constructeur en fonction de leur poids moléculaire.

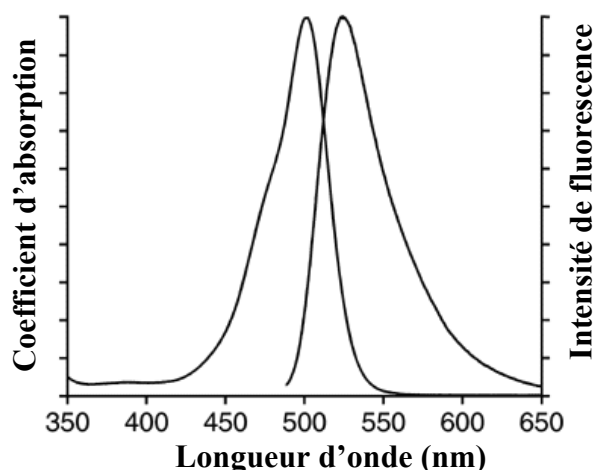


Figure III.2.3 : *spectres d'absorption et d'émission de fluorescence caractéristiques du FITC-dextran à pH 8 (notice d'information Molecular Probes).*

Comme dans le cas des billes de latex fluorescentes, les molécules de FITC-dextran sont couramment employées comme sondes fluorescentes en milieu biologique car elles présentent l'avantage de contenir un nombre important de fluorophores par particule, ce qui les rend très facilement détectables.

Dans le cadre de notre étude en microscopie de corrélation de fluorescence, les molécules de FITC-dextran ont été diluées dans le tampon TRIS (Tris(hydroxyméthyl)aminométhane) au pH physiologique (pH = 7,4). Les solutions ont été filtrées avant chaque utilisation.

III.2.3. Green Fluorescent Protein (rGFP).

La GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine fluorescente provenant initialement de la méduse *Aequorea victoria* et découverte en 1962 [Shimomura 1962]. Cette protéine, composée de 238 acides aminés, de masse moléculaire de 27 kDa a une structure en tonneau [Yang 1996] (figure III.2.3).

Le site actif fluorescent de la GFP, situé à l'intérieur de la structure en tonneau de la protéine, est un p-hydroxybenzylidène-imidazolidinone, synthétisé (suite à une réaction de cyclisation) à partir de l'enchaînement de trois acides aminés (Ser-Tyr-Gly) en position 65-66-67 [Reid 1997].

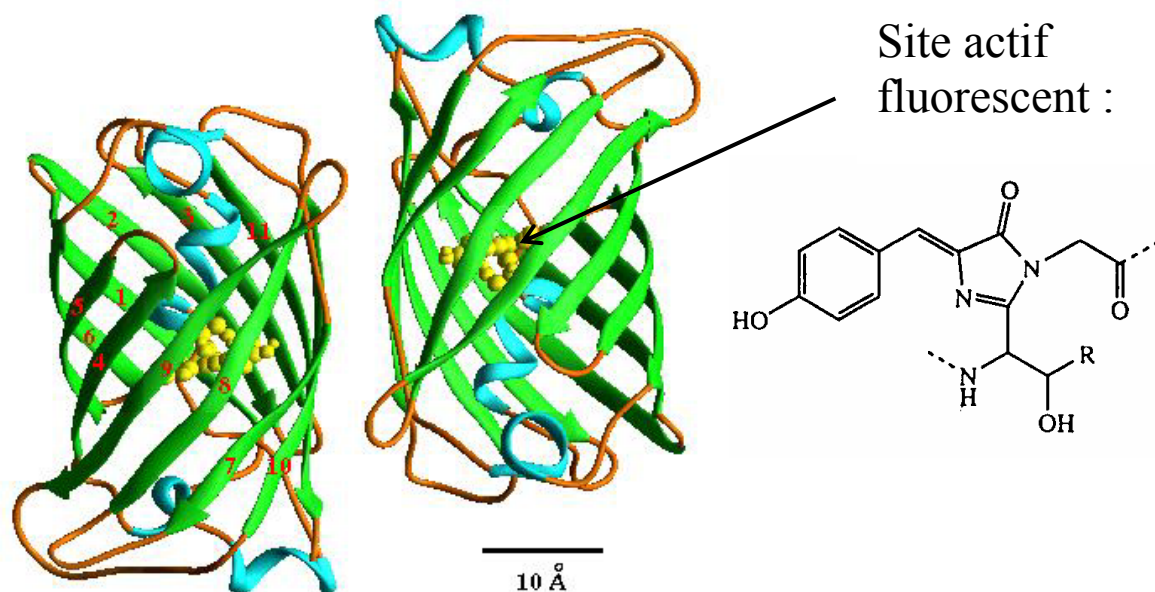


Figure III.2.4 : Structure de la protéine GFP et de son site actif fluorescent.

Depuis la réussite du clonage du code génétique de la GFP en 1992 [Prasher 1992], cette protéine suscite de nombreux intérêts dans le domaine de la biologie. En effet, il est possible de fusionner le gène de la GFP à celui de la protéine que l'on désire étudier. La protéine chimérique (protéine recombinante, protéine fusionnée) ainsi obtenue possède donc les propriétés de fluorescence de la GFP et devient facile à détecter. Cette nouvelle technique de marquage fluorescent, basée sur l'expression du gène de la GFP par une autre protéine devient alors très puissante et son domaine d'application pour la localisation et l'analyse des propriétés de protéines *in-vivo* connaît depuis quelques années un essor considérable [Tsien 1998]. Cette découverte récente est donc appelée à apporter des très nombreuses données mais certaines limitations subsistent : l'attachement de la GFP (dont la masse moléculaire n'est pas négligeable) sur une autre protéine peut en effet en modifier le fonctionnement.

La protéine GFP existe sous sa forme sauvage (rGFP : recombinant Green Fluorescent Protein) ou sous forme de différents mutants résultants de mutations génétiques effectuées sur le chromophore, chacune de ces espèces possédant des propriétés spectroscopiques différentes. Notre étude en corrélation de fluorescence par excitation à deux photons a été effectuée principalement sur la forme sauvage de la protéine. Pour un pH variant de 4 à 12, la rGFP existe sous deux formes stables correspondant à deux états de protonation du chromophore [Chattoraj 1996, Jung 1998]. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la rGFP sont représentés sur la figure III.2.5. Un premier maximum

d'absorption (monophotonique) à 392 nm est attribué à l'excitation de la forme neutre. Le second maximum d'absorption à 475 nm correspond quant à lui à l'excitation de la forme anionique. La fluorescence de la rGFP résulte alors de la désexcitation de la forme anionique de la molécule. Lors d'une excitation dans la première bande d'absorption (forme neutre), l'émission de fluorescence, maximale à 508 nm, a lieu suite à un transfert de proton qui se produit à l'état singulet excité de la protéine. Le spectre d'émission de fluorescence suite à une excitation dans la seconde bande d'absorption de la rGFP est quant à lui centré sur 503 nm.

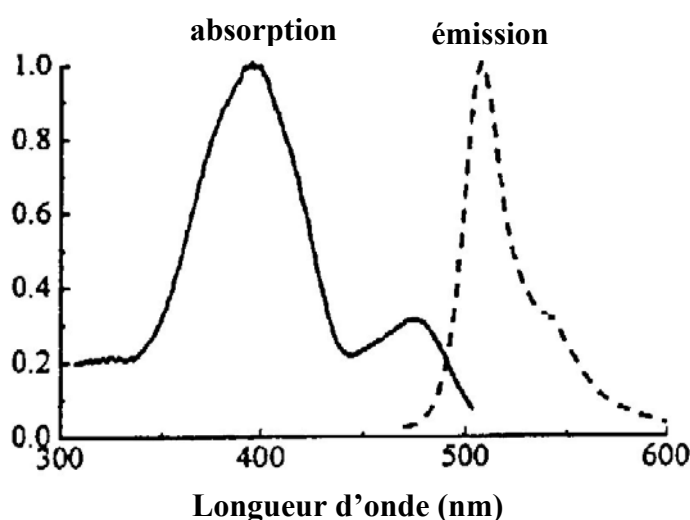


Figure III.2.5 : spectres d'absorption et d'émission de fluorescence normalisés de la rGFP [Tsien 1998].

Les propriétés spectroscopiques de la rGFP dépendent par ailleurs du pH du milieu [Widengren 1999]. En effet, un changement de pH induit un déplacement de l'équilibre entre les deux espèces ioniques et donc une modification des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence. La rGFP peut ainsi être utilisée comme sonde de pH. Ces propriétés de dépendance au pH ne faisant pas l'objet de notre étude, nous ne les expliquerons pas ici précisément. Nous noterons simplement que les caractéristiques d'absorption et d'émission de fluorescence sont peu modifiées sur une gamme de pH de 6 à 9.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés également à deux espèces mutantes de la GFP : la rGFP-UV et la rEGFP. La première de ces deux espèces présente un maximum de fluorescence pour une excitation à 392 nm : les spectres d'absorption et d'émission restent centrés sur les mêmes longueur d'onde que celles caractérisant l'espèce sauvage rGFP mais l'amplitude du spectre d'absorption à 392 nm est considérablement

augmentée au détriment de la composante absorbant à 475 nm qui devient négligeable. Cette espèce existe donc majoritairement sous forme neutre. La rEGFP existant sous forme anionique principalement, est quant à elle caractérisée par un spectre d'absorption décalé vers le rouge (absorption maximale à 490 nm). Son spectre d'émission de fluorescence demeure le même que celui de la rGFP.

Lors de nos études, les trois protéines fournies par Clontech Laboratories, Inc, ont été diluées dans un tampon TRIS 5 mM/l pH 8.

III.2.4. Fluorescéine.

La fluorescéine est le plus petit fluorophore que nous avons utilisé pour nos étude de corrélation de fluorescence (rayon d'environ 0,7 nm). Les spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine mesurés à pH 9 sont représentés sur la figure III.2.5.

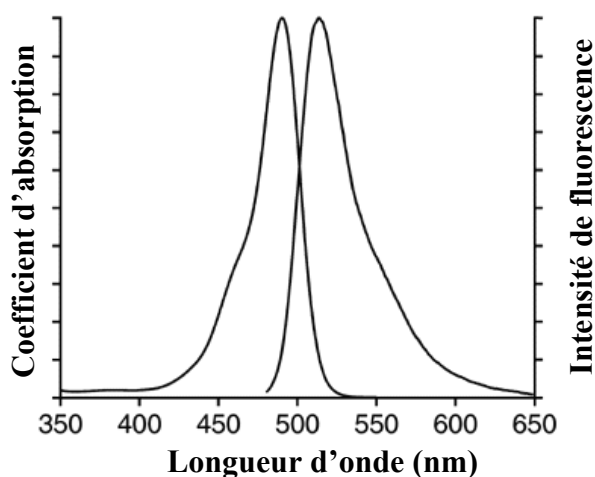


Figure III.2.6 : *spectres d'absorption et d'émission de fluorescence caractéristiques de la fluorescéine à pH 9 ((notice d'information Molecular Probes).*

Nous noterons que les propriétés spectroscopiques de la fluorescéine dépendent du pH [Martin 1975, Klonis 1996]. En effet, sur une échelle de pH variant de 5,5 à 9,9, la molécule existe principalement sous deux formes : I- monoanionique, et II- dianionique (figure III.2.6). À pH=5,5, la fluorescéine existe majoritairement sous la forme I. Toute augmentation du pH entraîne un déplacement de l'équilibre. Ainsi, à pH=9,9, la fluorescéine existe principalement sous la forme II.

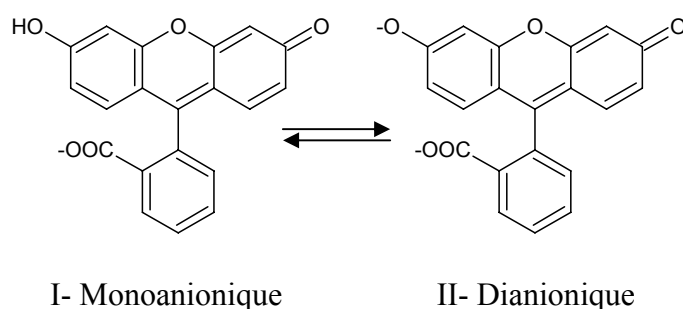


Figure III.2.7 : équilibre entre les deux états de protonation de la fluorescéine pour un pH variant de 5,5 à 9,9.

Ces deux formes de la fluorescéine possèdent des propriétés de fluorescence différentes (tableau III.2.2). En effet, la forme II est caractérisée par un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique de fluorescence beaucoup plus élevé que pour la forme I.

Forme	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Q
I	475	31000	0,25-0,35
II	491	88000	0,93

Tableau III.2.2 : longueur d'onde d'absorption λ_{abs} correspondant à un coefficient d'extinction molaire ϵ maximal pour les deux formes I et II de la fluorescéine et rendement quantique de fluorescence Q correspondant.

En raison de ces propriétés, la fluorescéine est couramment employée en milieu biologique en tant que sonde de pH.

Lors de nos études, la fluorescéine fournie par Sigma, a été diluée dans un tampon TRIS 5 mM/l pH 7.

III.3. Vérification des conditions d'excitation à deux photons pour la microscopie de corrélation de fluorescence.

Une première étape nécessaire aux études de microscopie de fluorescence sous EDP est la détermination des longueurs d'onde d'excitation correspondant à une émission de fluorescence optimale des fluorophores. Pour nos mesures en corrélation de fluorescence, nous avons choisi d'utiliser une longueur d'onde d'excitation à deux photons de $\lambda=800$ nm. Cette longueur d'onde convient en effet parfaitement à l'excitation de la fluorescéine et du FITC (absorption à deux photons maximale vers 800 nm). L'excitation à deux photons de la

protéine rGFP à cette longueur d'onde a par ailleurs déjà été réalisée expérimentalement [Xia 1999]. D'autre part, l'excitation de la fluorescence des billes de latex (dont le fluorophore est inconnu) s'effectua dans ces conditions sans aucune difficulté.

Chaque étude en corrélation de fluorescence d'une particule ou d'une molécule nécessite par ailleurs une caractérisation préliminaire des conditions d'excitation. En effet, les effets de saturation ou de photo-blanchiment pourraient fausser les résultats obtenus. La vérification des conditions d'excitation consiste à étudier la variation de l'intensité de fluorescence émise par les particules ou molécules concernées en fonction de l'intensité laser incidente. La figure III.3.1 représente les courbes obtenues pour les quatre fluorophores.

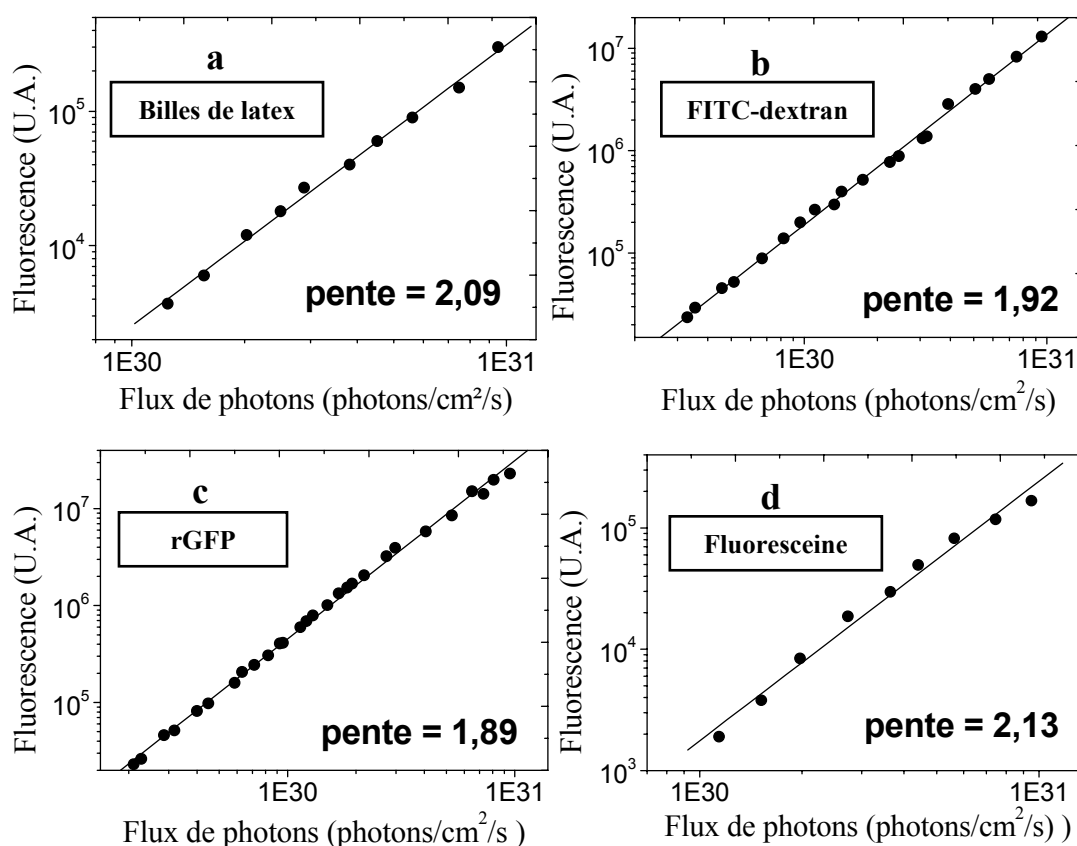


Figure III.3.1: nombre de photons de fluorescence comptés par unité de temps (10 s) en fonction du flux de photons incidents pour :

- (a) les billes de latex fluorescentes de 28 nm de rayon en suspension dans l'eau,
- (b) le FITC-dextran de 150 kDa (tampon TRIS 5 mM/l à pH 7),
- (c) la rGFP (tampon TRIS 5 mM/l à pH 7),
- (d) la fluorescéine (tampon TRIS 5 mM/l à pH 7).

La pente des droites est donnée avec une précision de 10 %.

La variation du flux de photons de fluorescence émis en fonction du flux de photons incidents, représentée en échelle logarithmique, est linéaire pour chacun des fluorophores. La

pente de la droite, dont la valeur est proche de deux, confirme que le processus à l'origine de l'excitation de la fluorescence est une absorption à deux photons uniquement. De plus, aucun effet de saturation ni de photo-blanchiment n'est ici observé sur toute la gamme de puissances laser utilisées.

Nous noterons, à titre indicatif, que le flux de photons maximal de $9,5 \times 10^{30}$ photons/cm²/s correspond à une puissance moyenne d'environ 120 mW mesurée sans atténuation du faisceau exciteur au point focal de l'objectif. Cette valeur relativement faible de la puissance moyenne mesurée au point focal de l'objectif (puissance moyenne en sortie du laser d'environ 800 mW) montre l'existence de nombreuses pertes d'énergie au cours du trajet du faisceau à travers les différents éléments optiques du montage (miroirs, lentilles, prismes, dichroïque et objectif).

III.4. Calibration du volume d'excitation.

Une première étape primordiale avant toute mesure de corrélation de fluorescence consiste en une calibration du volume d'excitation, c'est-à-dire en une détermination précise des paramètres de dimension ω_0 et z_0 de ce volume. En effet, le rapport ω_0/z_0 intervenant lors de l'ajustement de la courbe de corrélation théorique avec les données expérimentales, une valeur erronée de ce paramètre se répercuterait sur la valeur du temps de diffusion. D'autre part, le calcul du coefficient de diffusion moléculaire D_t nécessite la connaissance du paramètre ω_0 ($D_t = \omega_0^2 / 8\tau_D$). Il est donc essentiel de trouver un procédé permettant une calibration du volume d'excitation en limitant le risque d'erreurs et les incertitudes sur les valeurs de ω_0 et z_0 .

III.4.1. Calibration par imagerie de fluorescence

Une première estimation du paramètre ω_0 a été effectuée par une technique d'imagerie de l'intensité de la fluorescence émise par les billes de latex fluorescentes de 110 nm de diamètre piégées dans un gel d'acrylamide. Ce gel a été préparé avec les composés suivants :

- 9 g d'acrylamide + 0,25 g de bis acrylamide dissous dans 30 ml d'eau,
- 69,2 ml de tampon TRIS pH 8,3,
- 200 μ l de TEMED (tétraméthyléthylènediamine),
- 600 μ l de persulfate d'ammonium à 10 %.

Les billes de latex fluorescentes en suspension dans l'eau sont rajoutées à ce mélange. Nous noterons que la solution initiale contenant les billes doit être suffisamment diluée de manière à ce que la concentration en billes à l'intérieur du gel soit d'environ une bille par élément de volume de $10 \mu\text{m}^3$.

Une cartographie de la fluorescence émise par les billes est alors construite point par point. Le nombre de photons de fluorescence émis pour chaque point de l'échantillon pendant un intervalle de temps précis (typiquement 10 ms) est enregistré, le passage d'un point à un autre s'effectuant au moyen de la platine de translation dont est équipé notre microscope. Le mode d'acquisition des images d'intensité de fluorescence sera décrit plus précisément dans le chapitre IV.

L'image d'une bille de latex fluorescente piégée dans un gel d'acrylamide, présentée sur la figure III.4.1-a (image de 40×40 points), a été obtenue en appliquant le pas de translation minimal de la platine de $0,125 \mu\text{m}$.

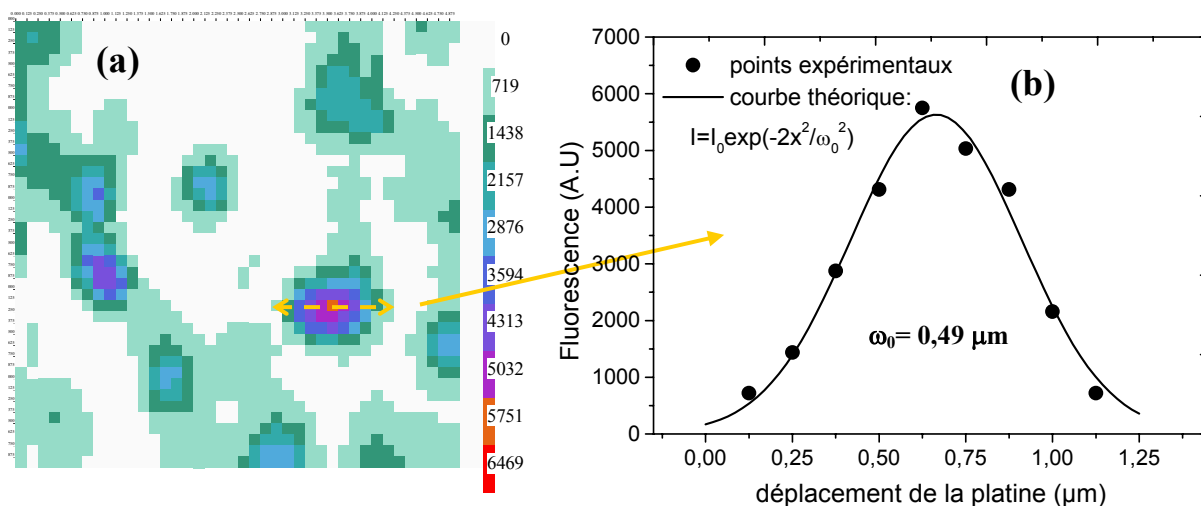


Figure III.4.1: (a) Image de la fluorescence émise par une bille de latex fluorescente piégée dans un gel d'acrylamide, (b) reconstruction du profil spatial de l'intensité de fluorescence le long de la ligne matérialisée en pointillés.

Le profil spatial de l'intensité de fluorescence émise peut alors être reconstruit d'après cette image donnant accès à la valeur de la dimension radiale du volume d'excitation, ici $\omega_0 = 0,49 \mu\text{m}$ (figure III.4.1-b).

Plusieurs acquisitions d'images ont été effectuées suivant ce procédé de manière à corroborer ce résultat conduisant à des valeurs de ω_0 variant de $0,45$ à $0,56 \mu\text{m}$.

Cette méthode fournit ainsi une bonne estimation de la dimension radiale du volume d'excitation, mais souffre néanmoins de la limitation du pas de translation minimal de la platine de 125 nm ne permettant l'acquisition que d'une dizaine de points pour la reconstruction du profil d'intensité de fluorescence.

III.4.2. Calibration par mesure de corrélation de fluorescence.

Le deuxième procédé employé dans un but de calibration du volume d'excitation est directement basé sur une mesure de corrélation de fluorescence. Il consiste à utiliser une particule parfaitement sphérique dont on connaît le rayon avec précision. Dans ce cas, la constante de diffusion peut être calculée suivant la formule de Stokes :

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R}, \quad (\text{III.4.1})$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin, η la viscosité du solvant en centipoise et R le rayon de la particule.

La calibration du volume d'excitation s'effectue alors par l'acquisition d'une courbe de corrélation de fluorescence de manière à déterminer les paramètres τ_D et ω_0/z_0 (équation III.1.4 avec F et τ_r mis à 0). Connaissant la valeur de D_t et τ_D , on en déduit ω_0 , puis z_0 .

Dans un premier temps, nous avons utilisé pour cette étude les billes de latex fluorescentes de 28 nm de diamètre. À la température ambiante $T = 295$ K, et pour la viscosité de l'eau à cette température $\eta = 0,9579$ cp, le coefficient de diffusion de ces billes calculé suivant l'équation III.4.1 est égal à $1,6 \times 10^{-7}$ cm²/s. Par soucis de précision, cette valeur a été vérifiée par des mesures en diffusion de la lumière (réalisées par Bernard Arrio, Laboratoire de Photophysique Moléculaire) conduisant à un résultat similaire du coefficient de diffusion et confirmant la taille moyenne de ces particules.

La figure III.4.2 présente une courbe de corrélation typique obtenue pour ces billes de latex fluorescentes excitées par un flux de photons incidents de $1,6 \times 10^{30}$ photons/cm²/s (puissance moyenne au foyer de l'objectif : 20 mW).

Considérant la taille et le rendement de fluorescence élevé de ces particules, du au fait que chaque bille contient un nombre important de molécules fluorescentes, l'acquisition des fonctions de corrélation a été réalisée ici sans aucune difficulté (courbes obtenues sur 10 cycles d'acquisition seulement, correspondant à une durée totale d'acquisition de 300 s).

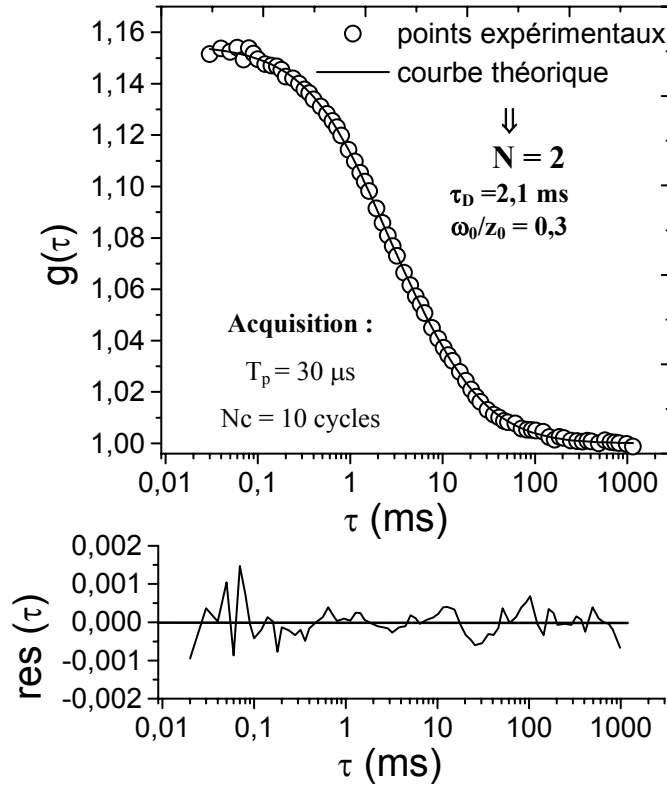


Figure III.4.2: courbe de corrélation de fluorescence obtenues pour les billes de latex fluorescentes de 28 nm de diamètre en suspension dans l'eau et résidus $res(\tau)$ obtenus suite au traitement des données.

L'analyse des données a ici été effectuée en considérant un processus de diffusion uniquement.

Cette mesure de corrélation de fluorescence a été répétée plusieurs fois afin de préciser la valeur des paramètres τ_D et ω_0/z_0 . Nous avons obtenu des valeurs de τ_D variant entre 1,8 ms et 2,4 ms et des valeurs de ω_0/z_0 comprise entre 0,25 et 0,35, ce qui correspond aux paramètres de dimension du volume d'excitation suivants:

$$0,48 \mu\text{m} < \omega_0 = \sqrt{8\tau_D D_t} < 0,55 \pm 0,04 \mu\text{m},$$

$$1,5 \mu\text{m} < z_0 < 1,9 \mu\text{m}.$$

Afin d'affiner encore la valeur de ce résultat et de s'assurer de sa validité, la calibration du volume d'excitation par mesure de corrélation de fluorescence a été effectuée par des tests de variation de coefficients de diffusion avec la viscosité des solutions.

L'acquisition de courbes de corrélation de fluorescence a ainsi été effectuée sur les billes de latex de 28 nm de diamètre en suspension dans des mélanges eau/glycérol de viscosités

connues (tableau III.4.1). L'effet des variations de viscosité sur les courbes de corrélation est représenté sur la figure III.4.3.

Viscosité (cp)	Pourcentage d'eau	Pourcentage de glycérol
0,96	100	0
1,7	80	20
3,5	60	40
5,7	50	50
10,2	40	60

Tableau III.4.1 : viscosité des solutions en fonction du pourcentage d'eau et de glycérol ajouté.

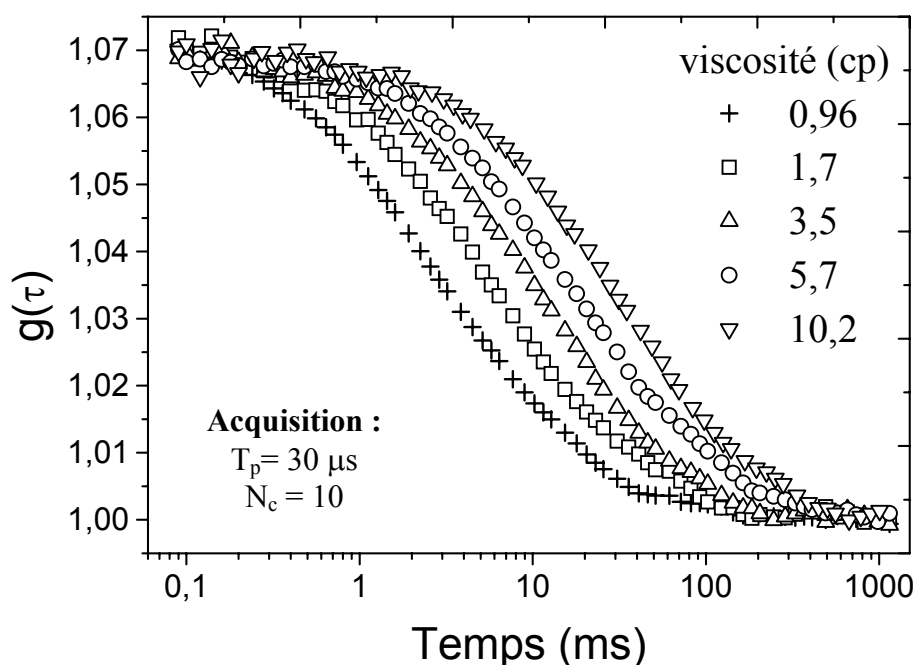


Figure III.4.3: courbes de corrélation de fluorescence des billes de latex fluorescentes de 28 nm de diamètre en fonction de la viscosité du solvant. Flux de photons incident : $1,6 \times 10^{30}$ photons/cm²/s.

Suite au traitement des courbes de corrélation obtenues, les valeurs des temps de diffusion en fonction de la viscosité sont obtenus (figure III.4.4).

Nous avons pu constater que, lors du traitement des données, la valeur du paramètre ω_0/z_0 qui permettait le meilleur ajustement des courbes théoriques avec les données expérimentales était $\omega_0/z_0 = 0,3$. D'autre part, nous avons pu remarquer qu'une petite variation autour de cette valeur n'affecte quasiment pas le temps de diffusion. Le paramètre ω_0/z_0 sera ainsi fixé pour toutes les prochaines études en corrélation de fluorescence à cette valeur 0,3.

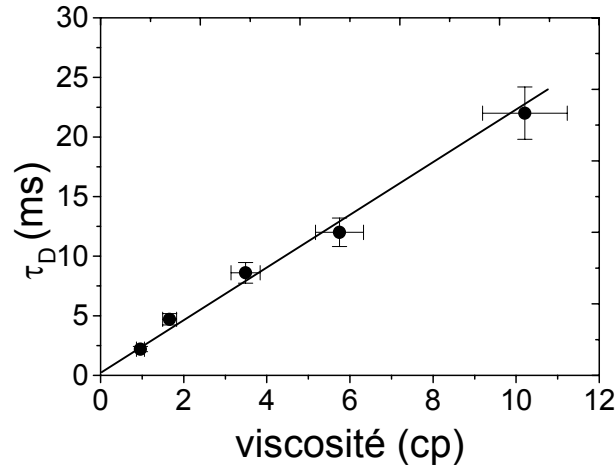


Figure III.4.4 : variation du temps de diffusion avec la viscosité du solvant pour les billes de latex fluorescentes de 28 nm de diamètre. Les barres d'erreurs ont été placées en estimant à 10 % l'incertitude sur les valeurs des temps de diffusion et de la viscosité.

Considérant l'équation III.4.1 et l'expression du temps de diffusion : $\tau_D = \omega_0^2 / 8D_t$, celui-ci peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{8D_{\text{eau}}\eta_{\text{eau}}}\eta, \quad (\text{III.4.2})$$

où η et η_{eau} désignent respectivement la viscosité du solvant et de l'eau, D_{eau} est le coefficient de diffusion de la molécule dans l'eau.

Selon cette expression, le temps de diffusion doit varier linéairement avec la viscosité. Cette propriété, que nous avons vérifiée expérimentalement (figure III.4.4), montre la fiabilité de notre technique. En considérant les incertitudes sur les valeurs des temps de diffusion mesurés et sur la viscosité, la pente de la droite varie de 1,9 à 2,3. La valeur de ω_0 peut finalement être déterminée, selon l'équation III.4.2, à partir de ces valeurs de la pente, soit dans notre cas $0,48 \mu\text{m} < \omega_0 < 0,53 \mu\text{m}$.

Considérant les divers résultats obtenus au cours de cette étape de calibration du volume d'excitation, les valeurs de ω_0 et z_0 peuvent être définies avec beaucoup de précision. Nous leur attribuerons les valeurs suivantes :

$\omega_0 = 0,50 \pm 0,04 \mu\text{m}$ $z_0 = 1,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$

Le volume d'excitation ainsi défini dans nos conditions expérimentales est d'environ $3 \mu\text{m}^3$.

Nous noterons que ces paramètres de dimensions du volume peuvent varier suivant l'alignement des différents éléments optiques du montage. Il est donc nécessaire de renouveler fréquemment les mesures de calibration, afin de contrôler la reproductibilité des conditions expérimentales menant à ce résultat. Dans ce but, des acquisitions de courbes de corrélation sur les billes de latex de 28 nm de diamètre ont été effectuées régulièrement et après chaque reprise des procédures d'alignement de notre montage. Aucune variation majeure de la valeur de $\omega_0 n$ n'a été constatée.

III.5. Mesures de coefficients de diffusion moléculaires en solution : validation de la technique de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons.

Les paramètres de dimension du volume d'excitation étant déterminés avec précision, nous avons pu procéder à des mesures de coefficients de diffusion moléculaires en solution. Nous présenterons ici les résultats obtenus pour les molécules de FITC-dextran, de rGFP et de fluorescéine, dont les coefficients de diffusion ont déjà été déterminés par des méthodes autres que la corrélation de fluorescence par excitation à deux photons. Cette caractérisation de processus de diffusion moléculaire en solution a été menée dans le but de valider et de montrer les performances de notre technique et constitue par ailleurs la base des études en milieu biologique.

III.5.1. Mesures des coefficients de diffusion de molécules de FITC-dextran de différents poids moléculaires.

Les premières mesures de coefficients de diffusion ont été effectuées sur des molécules de FITC-dextran de poids moléculaires variant de 20 000 à 150 000 kDa. Rappelons que ces molécules, sont caractérisées par une géométrie sphérique et sont facilement détectables en microscopie de corrélation de fluorescence en raison du nombre élevé de fluorophores qu'elles contiennent. Cette propriété nous autorisa à utiliser des solutions de très faible concentration en FITC-dextran : 5 nM/l. Les courbes de corrélation ont été obtenues sous excitation des molécules par des flux de photons incidents variant de $3,2 \times 10^{30}$ pour les dextrans de 20 kDa (puissance moyenne incidente de 40 mW) à $1,6 \times 10^{30}$ photons/cm²/s pour ceux de 150 kDa (puissance moyenne incidente de 20 mW). Les courbes obtenues pour les molécules de FITC-dextran de 150 kDa et 40 kDa sont présentées sur la figure III.5.1.

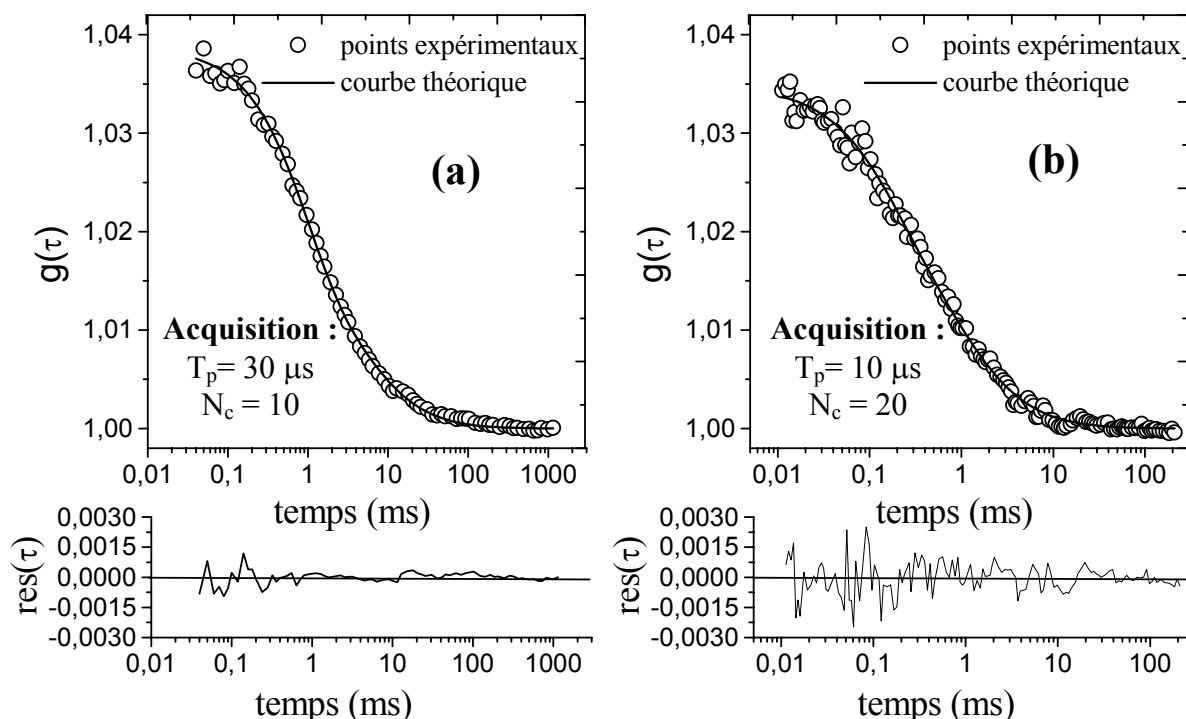


Figure III.5.1 : courbes de corrélation de fluorescence expérimentales et théoriques et résidus obtenus pour les molécules de FITC-dextran (concentration 5 nM/l dans le tampon TRIS 5 mM/l, pH 7) : (a) FITC-dextran de 150 kDa, (b) FITC-dextran de 40 kDa.

Les valeurs moyennes des temps de diffusion obtenues par notre technique de microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons et les coefficients de diffusion expérimentaux déterminés pour les molécules de FITC-dextran de quatre poids moléculaires différents sont regroupés dans le tableau III.5.1. À titre de comparaison, les valeurs théoriques des coefficients de diffusion D_{th} (calculés à partir de l'équation de Stokes) et les valeurs D_{FRAP} [Arrio-Dupont 1996] obtenues grâce à la technique de retour de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP, paragraphe I.4.4.3) sont aussi présentées.

FITC-Dextran	R (nm)	τ_D (ms)	D_{exp} ($\mu m^2/s$)	D_{th} ($\mu m^2/s$)	D_{FRAP} ($\mu m^2/s$)
20 000 Da	3,3	0,40	78	68	64 ± 2
40 000 Da	4,5	0,69	45	49	44 ± 5
70 000 Da	6	0,81	38	37	30 ± 2
150 000 Da	8,5	1,3	24	26	26 ± 2

Tableau III.5.1 : coefficients de diffusion des molécules de FITC-dextran en fonction de leur poids moléculaires.

Notre technique semble validée par ces résultats. En effet, la variation linéaire du temps de diffusion avec le rayon de la particule est ici vérifiée (Figure III.5.2).

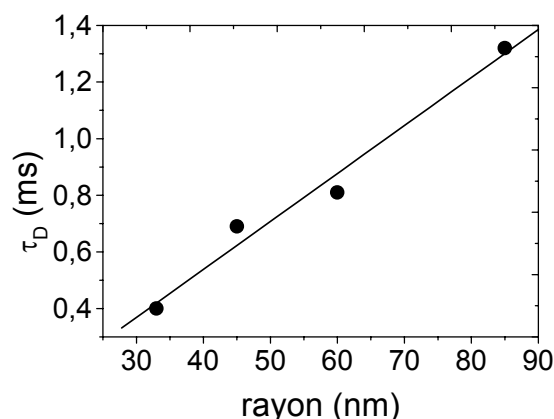


Figure III.5.2 : variation du temps de diffusion des molécules de FITC-dextran en fonction de leur rayon.

Par ailleurs, les valeurs expérimentales des coefficients de diffusion que nous avons obtenues sont en bon accord d'une part avec les valeurs calculées théoriquement selon l'équation de Stokes (III.4.1) et d'autre part, avec celles obtenues par la technique de FRAP, malgré les différences très importantes existant dans les conditions expérimentales de ces deux méthodes.

III.5.2. Étude en corrélation de fluorescence de la rGFP.

Cette deuxième étude de corrélation de fluorescence sous excitation à deux photons en solution a été effectuée sur la molécule de rGFP. Étant donné le manque de données sur les sections efficaces d'absorption à deux photons de la rGFP, nous avons dans un premier temps tenté d'effectuer une comparaison entre les propriétés d'absorption à un ou deux photons de la protéine. Dans ce but, nous avons mesuré pour la longueur d'onde d'excitation $\lambda = 800$ nm, l'intensité de fluorescence émise (ou plus exactement le nombre de photons émis par intervalle de temps) par les molécules de rGFP, rGFP-UV et rEGFP (tableau III.5.2).

Les résultats obtenus indiquent une meilleure efficacité d'absorption à deux photons à 800 nm pour la rGFP-UV que pour la rGFP. Par contre, cette longueur d'onde est inadaptée à l'excitation de la rEGFP. Les propriétés d'absorption des molécules de GFP pour une excitation à deux photons à 800 nm ou pour une excitation monophotonique vers 400 nm semblent donc similaires. Autrement dit, une excitation biphotonique à 800 nm correspond à une excitation dans la première bande d'absorption de la rGFP : on excite la forme neutre.

D'autre part, l'excitation à deux photons à cette longueur d'onde reste sélective : les sections efficaces d'absorption ne sont pas suffisamment étendues pour permettre une excitation de la forme anionique.

	Nombre de photons de fluorescence détectés par seconde Flux incident : $4,5 \times 10^{30}$ photons/cm ² /s	Nombre de photons de fluorescence détectés par seconde Flux incident : $9,5 \times 10^{30}$ photons/cm ² /s	Intensité relative
rGFP	13000	35000	0,87
rGFP-UV	15000	40000	1
rEGFP	1300	5000	0,1

Tableau III.5.2 : excitation à deux photons des protéines rGFP, rPGF-UV et rEGFP (concentration 80 nM/l dans tampon TRIS pH 8) à longueur d'onde $\lambda=800$ nm. Le nombre de photons de fluorescence détectés par seconde est présenté pour deux flux de photons incidents. L'intensité de fluorescence relative est le rapport entre le nombre de photons de fluorescence mesuré pour chacune des espèces et le nombre de photons de fluorescence maximal (celui de la rGFP-UV).

La GFP est caractérisée par un poids moléculaire d'environ 27 000 Da, poids comparable à celui du plus petit dextran utilisé précédemment. Cependant au contraire de la molécule de FITC-dextran, la molécule de GFP ne contient qu'un seul fluorophore ce qui la rend globalement moins fluorescente et plus difficilement détectable. Notre technique de microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons a néanmoins permis, sans trop de difficulté, l'acquisition de courbes de corrélation de la rGFP en solution (figure III.5.3). Il fut néanmoins nécessaire d'utiliser une solution de concentration plus élevée que dans le cas des FITC-dextran : solution de rGFP de 20 nM/l dans tampon TRIS pH 8. Le nombre de cycles N_c appliqué lors de l'acquisition fut aussi augmenté en raison d'une part, de la largeur des portes temporelles utilisée ici : $T_p=1$ μ s (au lieu de 30 μ s pour les FITC-dextran), et d'autre part, de l'intensité de fluorescence émise par molécule qui est beaucoup plus faible. Par ailleurs, le flux de photons incidents utilisé pour l'excitation de $4,5 \times 10^{30}$ photons/cm²/s (puissance moyenne incidente : 60 mW) est lui aussi plus élevé.

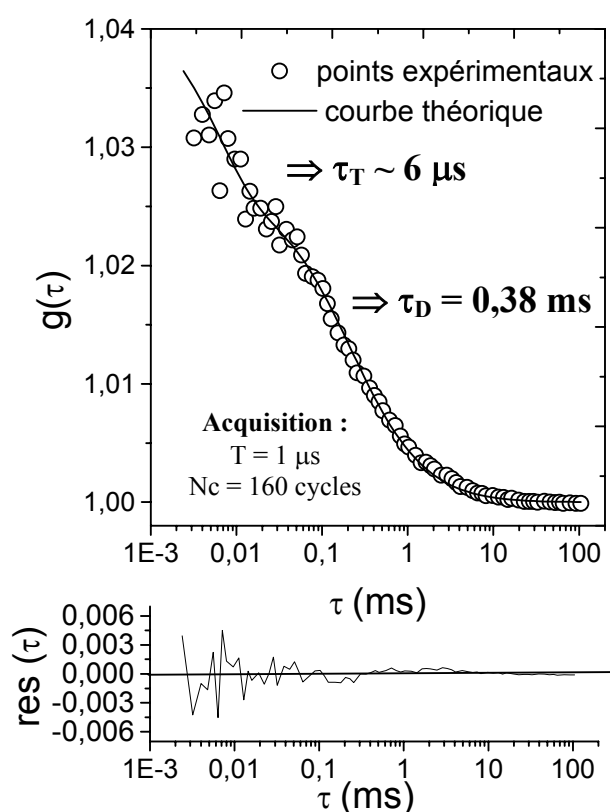


Figure III.5.3 : courbes de corrélation expérimentale et théorique de la rGFP 20 nM/l dans le tampon TRIS 20 mM pH 8 et résidus correspondants.

Deux composantes apparaissent dans la courbe de corrélation obtenue pour la rGFP. L'analyse des données est effectuée en prenant en compte l'existence d'un processus non radiatif rapide en plus du processus de diffusion. Nous considérerons tout d'abord la composante la plus lente qui résulte du processus de diffusion. Suite à l'ajustement de la courbe théorique aux points expérimentaux, nous avons déterminé le temps de diffusion de la rGFP : $\tau_D = 0,38 \text{ ms}$, ce qui correspond à un coefficient de diffusion $D = 8,3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Cette valeur est en bon accord avec le résultat $D = 8,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ obtenu en microscopie de corrélation de fluorescence par excitation monophotonique [Terry 1995] ou par la technique de FRAP [Swaminathan 1997]. Nous noterons que nous avons obtenu un résultat identique pour la protéine rGFP-UV.

L'existence d'une composante rapide telle que celle présente au début de la courbe de corrélation de fluorescence (figure III.5.3) a déjà été observée en microscopie de corrélation de fluorescence par excitation monophotonique [Haupts 1998, Widengren 1999] et résulte d'un processus de transfert de proton [Chattoraj 1996]. Cependant, dans notre cas, nous

n'avons pu analyser précisément cette composante en raison de limitations de notre technique. Tout d'abord, en raison de la durée des portes temporelles utilisées ($T_p = 1 \mu s$), nous n'obtenons ici qu'une partie de la composante rapide (constituée d'une dizaine de points seulement), ainsi une analyse précise est impossible dans nos conditions expérimentales. Il serait nécessaire d'utiliser des portes temporelles de très courtes durée ($\sim 100 \text{ ns}$) pour pouvoir reconstituer le profil complet de cette composante. Ceci est en principe réalisable avec la carte d'acquisition dont nous disposons, cependant, l'utilisation de portes temporelles de durées aussi courtes implique que le nombre de photons comptés par intervalle de temps sera extrêmement faible. L'acquisition des courbes de corrélation de fluorescence résolues aux temps courts exigerait alors des durées d'acquisition totale très longues (ou un nombre de cycles à appliquer très grand).

D'autre part, plusieurs tests d'acquisition de courbes de corrélation aux temps courts nous ont révélé l'existence d'une composante rapide apparaissant à des temps inférieurs à $10 \mu s$ quelque soit le type d'échantillon. La présence de cette composante rapide a pu entre autre être observée sur le calcul d'une courbe de corrélation à partir du bruit d'obscurité du PM et peut donc être considérée comme un signal d'appareil et une source d'erreur dans les mesures. Ce « bruit parasite » a déjà été constaté [Widengren 1998] et est attribué à un temps mort du PM. Ce problème peut être résolu par l'utilisation ou de la technique de corrélation croisée que nous envisageons de mettre en place et que nous décrirons plus précisément au paragraphe III.7. Suite au traitement des données, nous avons estimé la durée de la composante rapide à environ $6 \mu s$. Cette valeur est à considérer avec beaucoup de précaution, la durée de vie du processus non radiatif observé (consécutif à un transfert de proton [Haupts 1998, Widengren 1999]) étant probablement perturbée par la composante « parasite ».

Notre technique de microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons est donc à ce jour applicable uniquement à l'étude de processus diffusionnels et il nous est impossible d'analyser avec précision des processus rapides qui se manifestent à des durées inférieures à $1 \mu s$. Par contre, étant donnée la valeur du coefficient de diffusion de la rGFP que nous avons déterminé, proche des résultats obtenus par d'autres méthodes, nous confirmons les capacités et la validité de notre technique pour la détermination de coefficients de diffusion moléculaires.

III.5.3. Étude en corrélation de fluorescence de la fluorescéine : détection de la molécule unique.

Une dernière étude de corrélation de fluorescence sous excitation à deux photons en solution a été effectuée sur la molécule de fluorescéine afin de montrer l'extrême sensibilité de notre technique. En effet, de fluorescéine est la plus petite molécule ($\sim 0,7$ nm) que nous avons utilisée. Sa diffusion est donc plus rapide et par conséquent, le nombre de photons émis par intervalle de temps sera plus faible que dans la cas des macromolécules de types dextran ou GFP. De plus, elle n'est constituée que d'un seul fluorophore. Nous noterons tout de même, que la fluorescéine est caractérisée par une section efficace d'absorption à deux photons relativement élevée [Fischer 1995, Xu 1996a].

Afin de montrer l'extrême sensibilité de notre technique de MCF sous EDP, l'acquisition de courbes de corrélation de fluorescence a été effectuée sur une solution de fluorescéine de concentration 0,8 nM/l (dans le tampon TRIS 5 mM pH 7) sous un flux de photons excitateurs de $4,5 \times 10^{30}$ photons/cm²/s (puissance moyenne incidente : 60 mW) (figure III.5.4). Dans ces conditions, notre technique de MCF par EDP a néanmoins permis, en appliquant un nombre de cycles d'acquisition élevé, l'acquisition de courbes de corrélation de la fluorescéine. La courbe présentée ici est de bonne qualité (peu de dispersion dans les points expérimentaux) et prouve les performances de notre technique. Par ailleurs, un point important à remarquer ici, est le nombre moyen de molécules N contenu dans le volume d'excitation : $N = 0,8$. Ainsi, dans les conditions expérimentales utilisées pour cette mesure, le seuil de **détection d'une molécule unique** a été atteint, montrant l'extrême sensibilité de notre dispositif expérimental.

Malgré ces conditions, le temps de diffusion de la fluorescéine dans l'eau a été déterminé avec précision: $\tau_D = 110$ μ s.

La valeur du coefficient de diffusion correspondant : $D_t = 28 \times 10^7$ cm²/s est en bon accord avec le résultat obtenu en MCF par excitation monophotonique [Chen 1999].

Comme dans le cas de la rGFP, la courbe de corrélation ne correspond pas ici à un processus diffusionnel uniquement. En effet, on remarque l'existence d'une composante rapide au début de la courbe. Le processus non radiatif à l'origine de cette composante peut être attribué à une réaction de transfert de protons à l'état excité [Martin 1975], mais encore une fois, ce résultat est à considérer avec beaucoup de précautions en raison des limitations expérimentales exposées au paragraphe précédent.

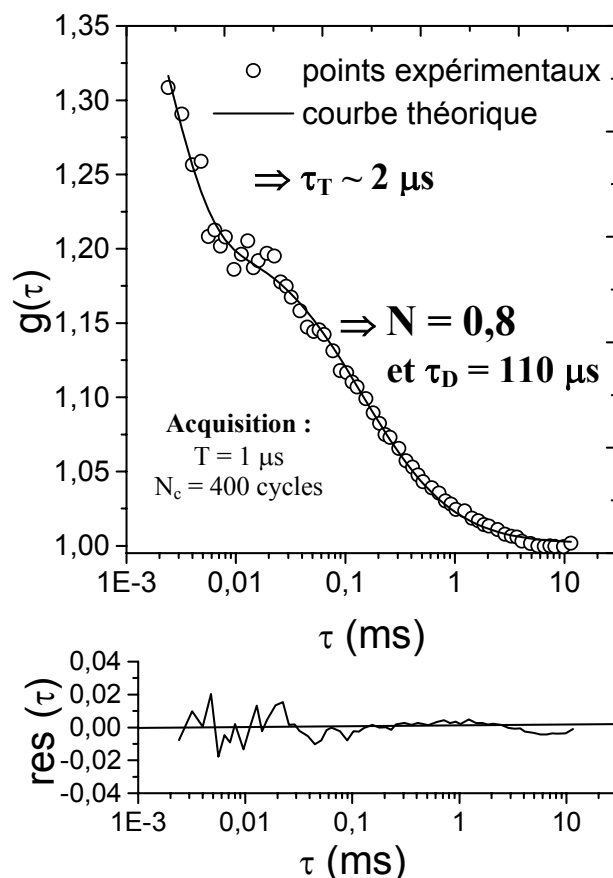


Figure III.5.4 : courbes de corrélation expérimentale et théorique de la fluorescéine 0,8 nM/l dans le tampon TRIS 5 mM pH 7 et résidus correspondants.

Cette étude sur la molécule de fluorescéine nous a permis de confirmer définitivement la validité de notre technique de MCF par EDP pour la détermination de coefficients de diffusion. Nous insisterons sur les performances de la technique, dont l'extrême sensibilité autorise des mesures précises sur des concentrations de fluorophores très faibles jusqu'à l'échelle de la molécule unique. Cette propriété reste vraie quelque soit la taille et la composition de la molécule (macromolécules comportant un ou plusieurs fluorophores ou petite molécule constituée d'un fluorophore unique). En terme de capacité de détermination des coefficients de diffusion et de sensibilité de détection, notre technique conduit à des performances comparables à celles précédemment obtenues en MCF par excitation à un photon ou à deux photons [Rigler 1993, Mertz 1995, Brand 1997].

À ce stade de l'étude, il nous restait à confirmer les possibilités d'applications de notre technique en milieu biologique vivant. Dans ce but, nous présentons dans le paragraphe suivant une application originale et innovante de la MCF à la caractérisation des mécanismes de diffusion moléculaire au sein de biofilms bactériens.

III.6. Application de la MCF par EDP à la caractérisation des mécanismes de diffusion au sein de biofilms de bactéries.

Les biofilms de bactéries sont omniprésents dans notre environnement et la plupart d'entre eux sont à l'origine de nombreux problèmes dans les secteurs de l'environnement, de la médecine ou de l'industrie. Par conséquent, le domaine de recherches concernant les méthodes de désinfection ou d'élimination des biofilms bactériens est particulièrement actif. Diverses études ont entre autre révélé leur forte résistance aux agents anti-bactériens, phénomène qui pourrait être attribué à des difficultés de diffusion ou de pénétration de ces molécules au sein de cette matrice organique. Dans ce contexte, nous avons appliqué la technique de MCF sous EDP à l'étude des possibilités de diffusion de sondes fluorescentes au sein de biofilms bactériens. L'influence de la taille et de la charge surfacique globale (définie par la charge électrique des ions présents à la surface des molécules) de différentes particules fluorescentes a été testée sur deux types de biofilms. Par cette méthode, des informations structurales et physico-chimiques ont pu être obtenues sur des biofilms bactériens à l'état natif.

III.6.1. Biofilms : définitions et contexte de l'étude en MCF par EDP.

Un biofilm peut être défini comme une communauté microbienne généralement contenue dans une matrice de polymères organiques, adhérant à une surface [Lappin-Scott 1995]. La formation de biofilms par les micro-organismes est un phénomène très commun, et de nombreuses études ont clairement établi que les bactéries pouvaient adhérer et coloniser la surface de la plupart des matériaux pour ensuite former un biofilm. Le processus de formation d'un biofilm est généralement divisé en quatre étapes : (1) le transport des micro-organismes, (2) l'adhésion initiale des cellules microbiennes au support, (3) la consolidation de l'adhésion par la synthèse de composés extracellulaires (polymères organiques), et (4) la colonisation du support par multiplication des cellules adhérentes et de la matrice de polymères organiques, formant le biofilm (figure III.6.1) [Busscher 1995].

Ces structures se forment généralement dans tous les environnements en contact avec des liquides naturels. Leur développement peut avoir des conséquences parfois bénéfiques et parfois indésirables, voire néfastes.

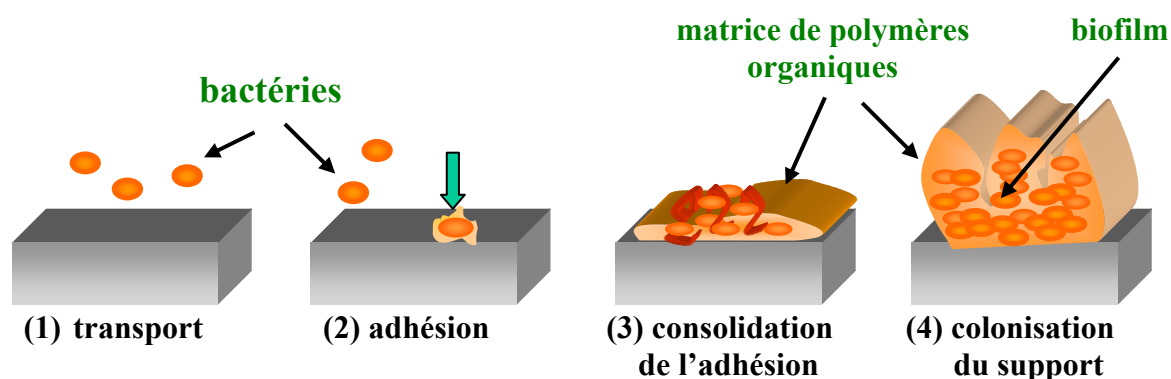


Figure III.6.1 : schéma illustrant le principe de formation d'un biofilm.

Biofilms à effets bénéfiques.

Le développement des biofilms a été mis à profit dans de nombreux procédés de fermentation et de filtration [Bryers 1993]. Par exemple, des biofilms sont utilisés pour la dégradation des déchets dans les stations d'épuration, le traitement des eaux usées, la dépollution des sols contaminés par des métaux lourds ou la biotransformation de contaminants toxiques. Les biofilms de bactéries sont aussi utilisés pour la biotransformation de composés chimiques dans l'industrie alimentaire. Par exemple, les biofilms composés de la bactérie *Acetobacter aceti* dont la propriété est d'oxyder l'éthanol en acide acétique, interviennent dans la fabrication de certains vinaigres [Bryers 1994].

Biofilms à effets indésirables.

Les problèmes consécutifs à la présence et au développement de biofilms bactériens sont nombreux et touchent différents secteurs d'activité.

Tout d'abord, la présence de biofilms est à l'origine de modifications des propriétés de la surface sur laquelle ils adhèrent, à l'origine d'effets de corrosion et de détérioration de matériau [Hamilton 1995]. Ce processus de corrosion microbienne se produit couramment dans les canalisations d'eau ou de transport de pétrole et de gaz, les circuits de refroidissement, ou encore dans le secteur de la construction navale (matériaux marins, coques de bateaux).

La présence de biofilms a par ailleurs un impact considérable dans l'industrie agro-alimentaire [Carpentier 1994]. Leur développement s'effectue généralement dans les zones peu accessibles au nettoyage (coudes de tuyauteries, tapis de convoyeurs, joints...) engendrant d'éventuelles pollutions ou contaminations. Les contaminations peuvent alors provenir directement de la composition du biofilm (biofilms composés de bactéries

pathogènes par exemple : *listeria*, *salmonelles*, etc). Les biofilms de bactéries se comportent aussi comme des pièges envers certains composés toxiques ou micro-organismes (métaux lourds, virus,...) engendrant d'éventuelles pollutions ou contaminations indirectes.

De nombreux problèmes dus à la formation de biofilms sont également constatés dans le secteur médical [Davies 1998]. Le plus commun d'entre eux est la formation de la plaque dentaire à l'origine des caries. D'autre part, malgré toutes les mesures d'hygiène employées en milieu hospitalier, des infections interviennent très souvent à la suite de la pose d'implants. La fixation de micro-organismes au contact des biomatériaux (prothèses, sondes urinaires, cathéters ou organes artificiels) renforce en effet leur résistance aux antibiotiques et aux défenses immunitaires. Les biofilms sont dans ce cas les principales causes de rejets et sont responsables de nombreuses infections.

Contexte de notre étude en microscopie de corrélation de fluorescence par excitation à deux photons.

Les bactéries contenues dans un biofilm peuvent présenter des caractéristiques microbiologiques très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries isolées en suspension). En particulier, de nombreuses études ont montré une plus grande résistance des cellules incluses dans un biofilm à différents stress tels que la privation nutritionnelle ou l'action de molécules désinfectantes. Certaines études ont en effet mis en évidence que des biofilms de bactéries résistaient pendant plus de 15 minutes à un traitement antibactérien, alors que les cellules d'une même souche en suspension étaient toutes éliminées en 30 secondes dans les mêmes conditions de traitement [Frank 1990]. Cette diminution de la sensibilité des cellules microbiennes a été constatée sur de nombreux biofilms quelque soit les bactéries qui les composent [Morton 1998]. D'autre part, différents travaux semblent indiquer que cet effet s'accroît avec le vieillissement du biofilm [Lee 1991]. Les mécanismes de résistance ne sont cependant pas encore clairement élucidés et différentes hypothèses sont avancées dont les plus courantes sont [Guilbert 1995, Mah 2001] :

- (1) un rôle protecteur de la matrice organique exocellulaire qui agit comme une barrière de diffusion ou de pénétration envers les agents antimicrobiens,
- (2) une croissance particulière du biofilm induisant des changements physiologiques suite à une restriction des apports nutritionnels,
- (3) un comportement physiologique spécifique (phénotype) des cellules piégées dans cette matrice.

Nous examinerons ici plus particulièrement la première hypothèse qui suggère que le biofilm joue un rôle de barrière de diffusion en raison de la présence de la matrice de polymères organiques. La résistance des biofilms aux traitements chimiques pourrait alors s'expliquer par une diffusion et une pénétration limitée voire impossible des molécules désinfectantes dans les biofilms. L'effet de résistance suggéré par la seconde hypothèse pourrait aussi faire intervenir ce phénomène de barrière de diffusion qui peut agir sur le transport des nutriments au sein des biofilms.

Afin de mieux comprendre ces phénomènes de résistance des biofilms aux agents antibactériens, diverses techniques sont utilisées pour étudier l'architecture de ces matrices organiques. La microscopie électronique à balayage est depuis longtemps employée, en raison de ses capacités de résolution spatiale, pour l'observation détaillée de la structure, la morphologie, et la composition des biofilms bactériens [Listgarten 1976, Theilade 1976]. Cependant cette technique requiert une déshydratation intensive (un biofilm est constitué d'eau à environ 90 %) et une métallisation des échantillons. Il est donc impossible par ce moyen de visualiser des biofilms à l'état natif. De plus, ces manipulations des biofilms obligatoires en microscopie électronique peuvent être à l'origine de distorsions importantes de leur structure initiale. Pour éliminer ce problème, les techniques de microscopie confocale de fluorescence ont été récemment exploitées pour l'observation de biofilms [Lawrence 1991, Costerton 1995, Wood 2000]. Les études menées grâce à cette technique révélèrent une structure très hétérogène des biofilms avec des groupements de bactéries et de composés exocellulaires séparés par des espaces contenant de l'eau autrement appelés canaux à eau. L'écoulement de liquides et donc la pénétration de molécules paraît alors possible à l'intérieur des biofilms.

Étant donnés ces résultats, différentes techniques ont alors été développées pour l'étude des possibilités de diffusion moléculaires au sein de biofilms bactériens. Des mesures de variation de coefficients de diffusion moléculaires à l'intérieur de biofilm ont ainsi été réalisées au moyen de la technique de retour de la fluorescence après photo-blanchiment (FRAP) ou des chambres de diffusion [Birmingham 1995, Bryers 1998, Stewart 1998] (voir chapitre I, paragraphe I.4.4). Nous rappellerons que ces méthodes sont particulièrement perturbatrices pour les milieux biologiques vivants et ne permettent que la détermination de coefficients de diffusion moyens.

Comparée à ces techniques, la microscopie de corrélation de fluorescence sous excitation à deux photons semble être particulièrement bien appropriée pour l'étude des possibilités de

diffusion au sein de biofilms bactériens. L'imagerie de biofilms sous EDP [Gerritsen 1999] a déjà prouvé les avantages de ce mode d'excitation en terme d'augmentation de la profondeur de pénétration et de la minimisation des photodommages. Considérant les avantages la MCF sous EDP, nous avons appliqué la technique à la caractérisation des mécanismes de diffusion de sondes fluorescentes au sein de biofilms.

III.6.2. Étude des mécanismes de diffusion au sein de biofilms de bactéries par MCF sous EDP.

III.6.2.1. Description des biofilms de bactéries utilisés.

Deux types de biofilms monomicrobiens ont été utilisés dans le cadre de notre étude en MCF sous EDP. Le premier est composé de la bactérie *Lactococcus lactis* OSM31 (*L. lactis*), ferment lactique utilisé pour la transformation alimentaire (laitière et charcutière). Le deuxième type de biofilm est composé de la bactérie *Stenotrophomonas maltophilia* B110 (*S. maltophilia*), souche d'altération fréquemment rencontrée sur les surfaces des ateliers alimentaires. Ces deux variétés bactériennes ont été choisies car elles constituent des modèles de biofilms aux caractéristiques très différentes. En effet, les biofilms de *L. lactis* sont constitués d'une matrice de bactéries adhérentes au sein de laquelle la concentration en composés extracellulaires est négligeable, alors que les biofilms de *S. Maltophilia* développent, lors de leur croissance, une matrice organique de polymères de type xanthanes [Bradbury 1984]. Les biofilms nous ont été procurés par l'Unité de Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (UBHM-INRA, Massy). N'ayant pas participé à la préparation des échantillons, nous ne décrirons que succinctement les procédés utilisés pour la culture des bactéries et la formation des biofilms : la croissance des biofilms a été effectuée à partir des bactéries en suspension mises en contact avec des lamelles de verre. L'utilisation, pour notre étude en MCF, d'un objectif de microscope à immersion de grande ouverture numérique impose l'emploi de lamelles couvre objet (surface 2 x 2 cm² et épaisseur 0,17 mm) en guise de support des biofilms. Ces lamelles ont préalablement été traitées avec une solution d'ions ferriques (solution de Fe(NO₃)₃) afin de favoriser les interactions électrostatiques et ainsi augmenter l'efficacité d'adhésion des bactéries. Au bout de 3 heures de mise en contact des bactéries en suspension avec les lamelles de verre, les bactéries non adhérentes sont éliminées par rinçage avec une solution de chlorure de sodium de concentration 150 mM/l. Le développement des bactéries sur le support en verre pour former un biofilm s'effectue ensuite en immergeant les échantillons dans un milieu de culture à base de glucose et en plaçant cet

ensemble pendant une journée dans une étuve (température 25°C pour les biofilms de *L. lactis* et 30°C pour les biofilms de *S. Maltophilia*). Les biofilms ainsi obtenus sont rincés 2 ou 3 fois à l'eau distillée avant leur utilisation en MCF. L'épaisseur des biofilms est estimée à environ 20 à 30 µm.

Pour chaque série de biofilms, quelques échantillons ont été observés à l'UBHM en microscopie électronique à balayage (microscope Jeol JSM 5200) afin de visualiser leur structure et de s'assurer de la reproductibilité du procédé de formation, de croissance et d'adhésion des biofilms sur les lamelles de verre. Pour ces observations, les biofilms ont subi les différents traitements préalablement requis en microscopie électronique : fixation des échantillons par une solution de glutaraldehyde (3 %), rinçage par une solution de cacodylate de sodium (0,2 mol/l, pH = 7,4), déshydratation par une succession de bains d'alcool et métallisation à l'or des biofilms par évaporation cathodique sous vide d'air.

Une deuxième observation de biofilms à l'état natif, n'ayant subi aucun traitement, a été effectuée en microscopie optique par transmission (éclairage en lumière blanche) directement avant les mesures en MCF sous EDP, grâce à notre microscope Zeiss Axiovert 135 (objectif 63x, ON= 1,4) relié à une caméra CCD (Sony modèle XC-77CE) et à une carte d'acquisition d'images (Data Translation, DT 3120).

L'observation du premier type de biofilm, constitué de la bactérie *L. lactis* (figure III.6.2) montre une structure très homogène des échantillons. Les lamelles de verre sont uniformément recouvertes par les bactéries adhérentes. Par ailleurs, l'image obtenue en microscopie électronique à balayage (MEB) montre la présence d'espaces inter-bactéries plus ou moins larges qui permettront probablement la diffusion et la pénétration de molécules au sein de ce type de biofilm (si ce ne sont pas des artefacts liés à la déshydratation des biofilms).

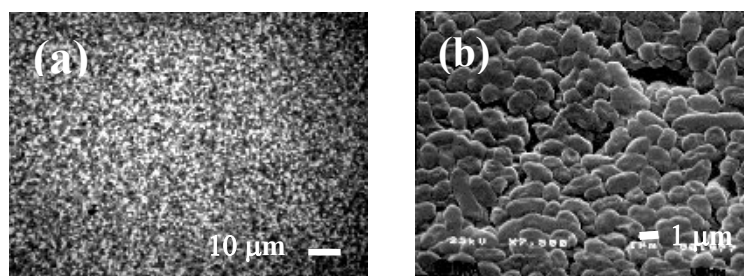


Figure III.6.2 : images des biofilms de *L. lactis* observés (a) en microscopie optique par transmission et (b) en microscopie électronique à balayage.

Au contraire, le second type de biofilm, constitué de la bactérie *S. maltophilia*, développe lors de sa croissance des polymères extracellulaires et est caractérisé par une structure hétérogène avec des zones plus ou moins denses et compactes (figure III.6.3).

Nous avons dans ce cas distingué trois types de structures locales :

- zone 1 : structure homogène avec peu de polymères extracellulaires,
- zone 2 : zone plus dense et donc plus riche en composés extracellulaires,
- zone 3 : structure la plus compacte avec une concentration importante de polymères extracellulaires. Ce type de structure appelée « en champignon » est typique et souvent rencontrée dans les biofilms bactériens. Nous noterons que la zone 2 est en fait une zone de type 3 en formation c'est-à-dire à un stade précoce de développement.

Il s'agira donc, lors de notre étude en MCF sous EDP d'étudier les possibilités de diffusion de molécules fluorescentes au sein de ces deux types de biofilms en fonction de leur composition et de leur structures locales. Par comparaison des résultats obtenus dans les biofilms de *L. lactis* et *S. maltophilia*, nous tenterons d'analyser l'influence de la présence des polymères extracellulaires sur les processus de diffusion moléculaire.

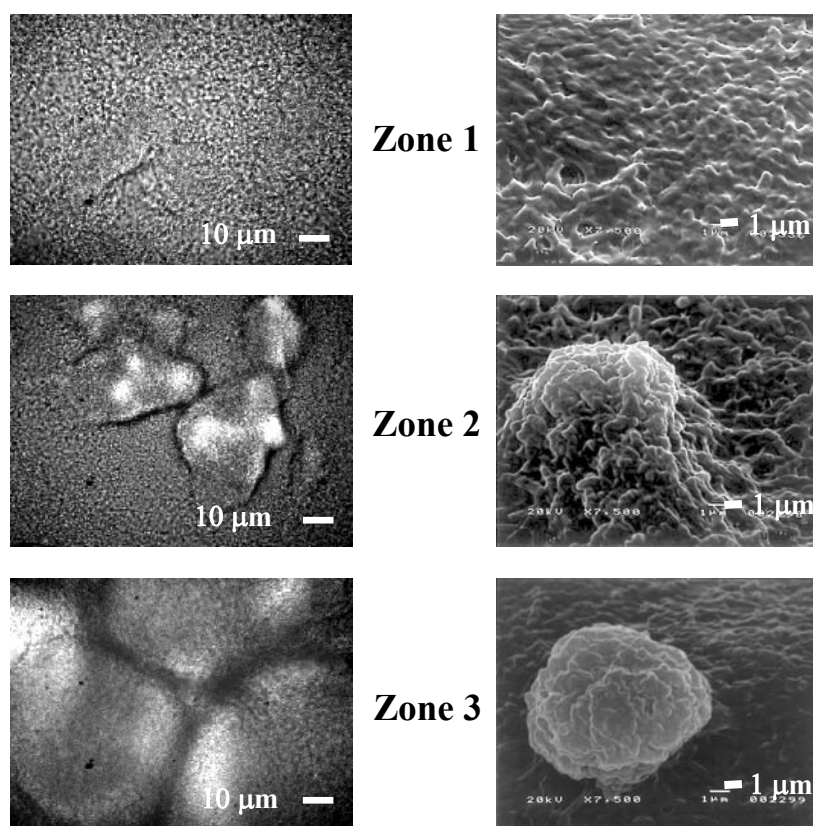


Figure III.6.3 : 3 types de structures locales observées dans les biofilms de *S. maltophilia* par microscopie optique par transmission (images de gauche) et par microscopie électronique à balayage (images de droite).

III.6.2.2. Fluorophores utilisés pour les études de diffusion par MCF sous EDP au sein des biofilms.

Pour la caractérisation des mécanismes de diffusion au sein des biofilms grâce à notre technique de MCF sous EDP, nous avons analysé l'influence de la taille des fluorophores et de leur charge de surface.

Nous avons utilisé pour ces études des sondes fluorescentes dont le processus de diffusion avait été préalablement caractérisé en solution : des molécules de FITC-dextran de poids moléculaire variant de 70 à 150 kDa et des billes de latex fluorescentes présentant à leur surface des groupements carboxylate. Des billes de latex présentant à leur surface des groupements amines ont également été utilisées (billes fabriquées à notre demande par la société Estapor). Le rayon de ces différentes particules est rappelé dans le tableau III.6.1.

Particules	Rayon (nm)
Billes de latex (traitement carboxylate)	14
	55
Billes de latex (traitement amine)	13
FITC-dextran, poids moléculaire 150 kDa	8,5
FITC-dextran, poids moléculaire 70 kDa	6
FITC-dextran, poids moléculaire 40 kDa	4,5

Tableau III.6.1. : rayons des particules fluorescentes utilisées pour les mesures de corrélation de fluorescence au sein des biofilms.

Pour une vérification quantitative de la charge surfacique globale des particules et une meilleure compréhension des effets d'interactions électrostatiques qui peuvent avoir lieu au sein des biofilms, des mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées sur les différents fluorophores utilisés et sur les deux types de bactéries composant les biofilms. Les particules en suspension que l'on désire étudier sont placées dans une cellule et sont soumises à un champ électrique qui provoque leur déplacement (figure III.6.4). Le sens de déplacement des particules détermine le signe de leur charge surfacique globale, et leur vitesse peut être reliée au potentiel électrocinétique (ζ) par l'équation de Smoluchowski [van Oss 1996] :

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\epsilon_m} M_E, \quad (\text{III.6.1})$$

avec ζ le potentiel électrocinétique (ou potentiel « zêta »), η la viscosité du milieu, ϵ_m la permittivité du milieu et M_E la mobilité électrophorétique des particules, donnée par la relation :

$$M_E = \frac{v}{E}, \quad (\text{III.6.2})$$

où E représente l'intensité du champ électrique et v la vitesse de déplacement des particules.

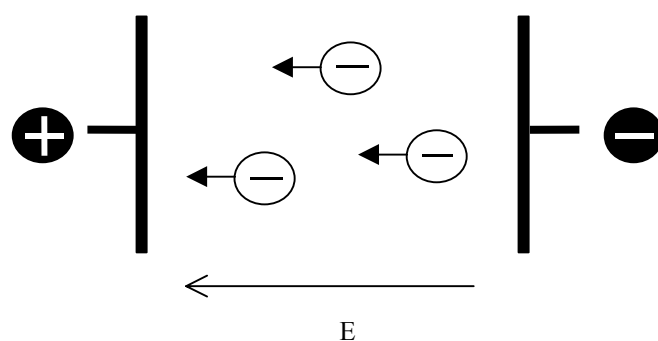


Figure III.6.4 : déplacement de particules négativement chargées sous l'action d'un champ électrique E .

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées à l'UBHM à l'aide d'un Zétamètre laser (Sephy II, CAD Instrumentation) dont le principe de fonctionnement est illustré sur la figure III.6.5.

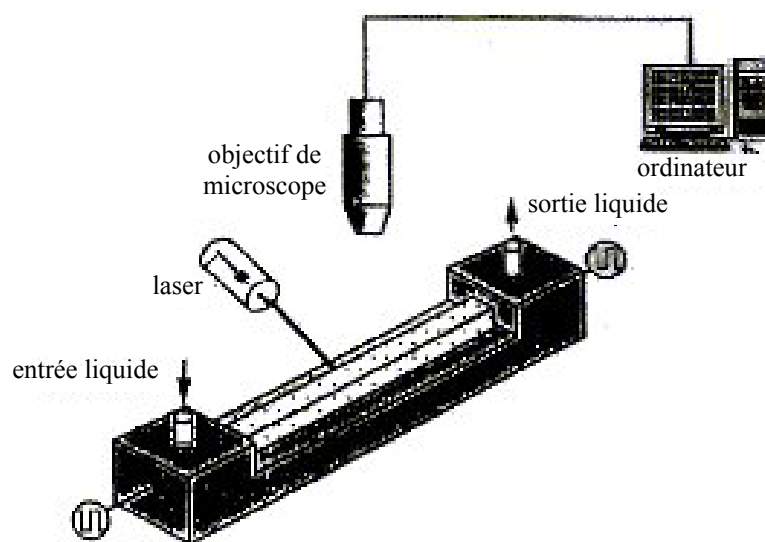


Figure III.6.5: dispositif expérimental du zétamètre Sephy II. Les particules sont éclairées par un faisceau laser, et leur vitesse de déplacement sous l'action d'un champ électrique est mesurée à l'aide d'une chaîne d'acquisition numérique.

Les particules sont introduites dans la cellule soumise à un champ électrique E , éclairées par un laser hélium-néon et visualisées grâce à un objectif de microscope. Un logiciel permet de mesurer la vitesse moyenne de déplacement des particules et calcule la mobilité électrophorétique, dont le signe et la valeur sont directement représentatifs de la charge globale de surface.

Les résultats, présentés dans le tableau III.6.2 révèlent une charge de surface globalement négative pour les FITC-dextran et les billes de latex de type carboxylate et une charge globalement positive des billes de latex de type amine. Ces études montrent par ailleurs une charge globale de surface négative pour les bactéries qu'il s'agisse des cellules planctoniques ou de cellules décrochées du biofilm (tableau III.6.3).

Fluorophores	Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m}/\text{V}/\text{s}/\text{cm}$)
Billes de latex (traitement carboxylate) rayon 55 nm	$-3,6 \pm 0,4$
Billes de latex (traitement carboxylate) rayon 14 nm	$-3,1 \pm 0,4$
Billes de latex (traitement amine) rayon 13 nm	$+2,0 \pm 0,2$
FITC-dextran de 150 kDa rayon 8,5 nm	$-1,5 \pm 0,3$

Tableau III.6.2: Mobilité électrophorétique mesurée au zétamètre pour les fluorophores utilisés dans l'eau distillée sous application d'un champ électrique de 50 V.

Bactéries	Mobilité électrophorétique des bactéries ($\mu\text{m}/\text{V}/\text{s}/\text{cm}$)	
	Cellules planctoniques en suspension	Cellules décrochées des biofilms
<i>S. maltophilia</i>	$-0,9 \pm 0,2$	$-0,5 \pm 0,3$
<i>L. lactis</i>	$-2,3 \pm 0,3$	$-3,0 \pm 0,2$

Tableau III.6.3: Mobilité électrophorétique mesurée au zétamètre pour les bactéries à $\text{pH}=6$ dans une solution de NaCl $1,5 \times 10^{-3} \text{ M/l}$ sous application d'un champ électrique de 50 V.

Le processus de diffusion des particules fluorescentes au sein des biofilms de bactéries analysé par MCF sous EDP permettra ainsi l'étude de deux types d'interactions entre les molécules fluorescentes et les constituants des biofilms :

- (1) - les interactions stériques : les possibilités de diffusion des particules en fonction de leur taille indiqueront la présence d'espace libres plus ou moins larges entre les constituants du biofilm (bactéries et polymères extracellulaires),
- (2) - les interactions électrostatiques à l'origine de l'adsorption éventuelle des molécules sur la surface du biofilm.

III.6.3. Diffusion de fluorophores au sein de biofilms de bactéries par MCF sous EDP- Résultats.

Avant d'exposer les résultats, nous préciserons qu'il nous fut impossible de réaliser des mesures de corrélation dans les biofilms sur des molécules de petite taille telles que la fluorescéine (de taille comparable à celle des désinfectants et antibiotiques). En effet, l'autofluorescence très intense des biofilms nécessita une atténuation drastique de l'intensité laser incidente au moyen de filtres neutres. L'excitation à deux photons des particules au sein des biofilms a en effet été effectuée grâce à un flux de photons incident de 8×10^{29} photons/cm²/s ce qui correspond à une puissance moyenne incidente de seulement 10 mW. Autrement dit, seulement 2.5 % de la puissance moyenne émise par notre laser ont été utilisés pour ces mesures. Ainsi, en raison des faibles concentrations moléculaires requises pour l'acquisition de courbes de corrélation de fluorescence et de cette atténuation très importante de l'intensité laser incidente, uniquement des particules contenant beaucoup de fluorophores ont pu être utilisées. C'est pourquoi notre étude a été limitée à l'utilisation des particules de FITC-dextran et des billes de latex fluorescentes.

L'introduction des particules fluorescentes à l'intérieur des biofilms a été effectuée par simple rinçage des biofilms avec des solutions de billes ou de FITC-dextran. Ces solutions ont été préparées dans les mêmes conditions que pour les études en solution présentées au paragraphe III.5, avec toutefois une concentration 2 à 3 fois plus élevée en raison de l'atténuation importante du faisceau laser incident. D'autre part, des filtres interférentiels passe-bande (largeur 40 nm) dont la transmission maximale correspond à la longueur d'onde d'émission des fluorophores (transmission maximale à 600 nm pour les billes de latex et à 550 nm pour les FITC-dextran) ont été placés devant le photomultiplicateur de détection afin

d'éliminer de façon plus efficace l'autofluorescence provenant des biofilms. Les acquisitions de courbes de corrélation au sein des biofilms sur les particules de FITC-dextran et les billes de latex fluorescentes ont été réalisées en utilisant des portes temporelles de durée $T_p = 10 \mu s$ et un nombre de 10 cycles.

Nous préciserons aussi que les courbes de corrélation présentées sont le résultat d'une diffusion de particules fluorescentes dans les espaces inter-bactéries ou canaux d'eau, la pénétration de celles-ci à l'intérieur des bactéries étant impossible en raison de leur taille.

III.6.3.1. Mesures de corrélation dans les biofilms de *L. lactis*.

Des mesures de corrélation de fluorescence des particules de FITC-dextran (poids moléculaire de 40 à 150 kDa) et des billes de latex fluorescentes cationiques (rayon 13 nm) et anioniques (rayon de 14 à 55 nm) introduites dans les biofilms de *L. lactis* ont été effectuées à différentes localisations sur des plans horizontaux et à différentes profondeurs de pénétration dans les biofilms.

Ces mesures ont apporté les résultats décrits ci dessous.

(1) Les courbes de corrélation obtenues pour toutes les particules anioniques de rayon inférieur à 55 nm à l'intérieur des biofilms de *L. lactis* sont identiques à celles obtenues pour ces mêmes particules dans l'eau. Ce résultat a été obtenu quelque soit la profondeur de pénétration et la localisation dans le biofilm. Ce point est illustré sur la figure III.6.4 qui représente les courbes obtenues pour les billes de latex fluorescentes de rayon 14 nm et chargées négativement.

(2) Aucune corrélation n'a pu être observée avec les billes de latex fluorescentes de charge de surface positive quelque soit la zone du biofilm sondée (figure III.6.6).

(3) Les courbes de corrélation obtenues pour les billes anioniques de 55 nm de rayon présentent des distorsions plus ou moins importantes suivant la zone du biofilm sondée. La figure III.6.7 montre les courbes obtenues pour ces particules en différents points du biofilm.

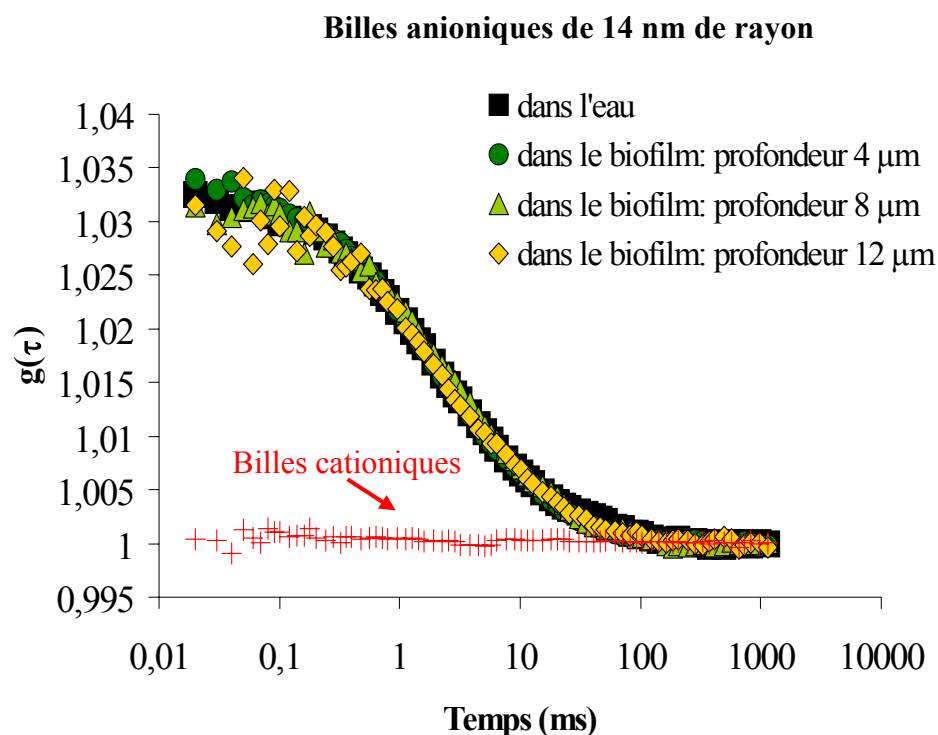


Figure III.6.6 : courbes de corrélation de fluorescence des billes de latex anioniques de 14 nm de rayon dans un biofilm de *L. lactis*. Les courbes acquises à différentes profondeurs de pénétration dans le biofilm sont comparées avec celle obtenue précédemment dans l'eau. Aucun signal de corrélation n'a été obtenu avec les billes de latex cationiques de 13 nm de rayon dans le biofilm de *L. lactis*.

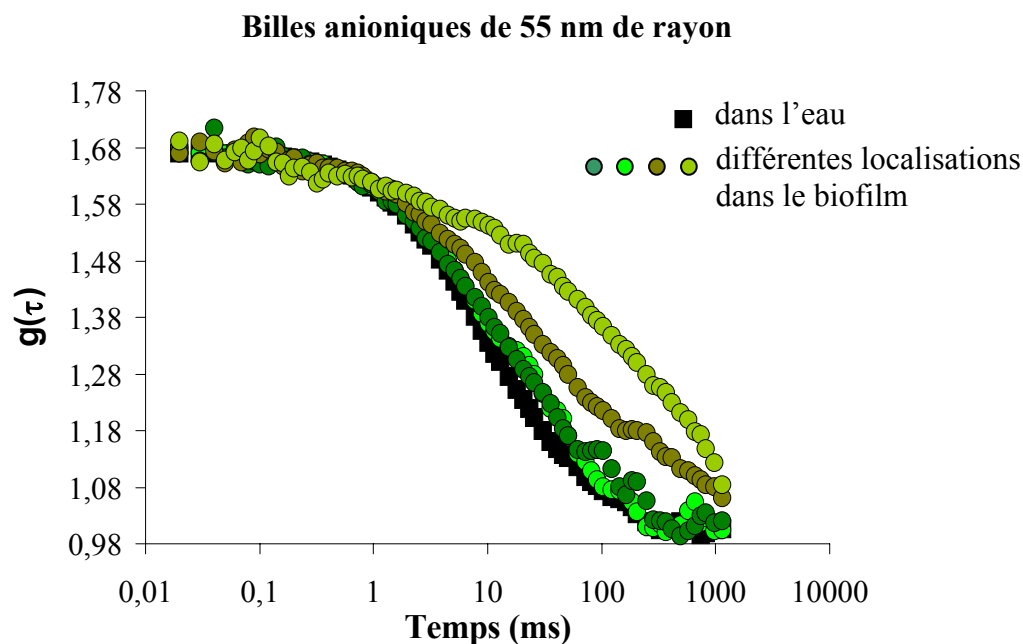


Figure III.6.7: courbes de corrélation de fluorescence des billes de latex anioniques de 55 nm de rayon dans un biofilm de *L. lactis*. Les courbes acquises en différents points du biofilm sont comparées avec celle obtenue précédemment dans l'eau.

Ces divers résultats seront discutés globalement au paragraphe III.6.3.3, après avoir présenté les résultats concernant les mesures de corrélation de fluorescence dans les biofilms de *S. maltophilia*.

III.6.3.2. Mesures de corrélation dans les biofilms de *S. maltophilia*.

En raison de l'hétérogénéité des biofilms de *S. maltophilia*, des mesures de corrélation ont été dans ce cas effectuées séparément dans les trois types de structures locales du biofilm. Notons que les conditions d'acquisition furent les mêmes que pour les mesures réalisées dans les biofilms de *L. lactis*.

(1) Des courbes de corrélation identiques à celles obtenues pour les particules dans l'eau n'ont été observées que pour les molécules de FITC-dextran (rayon de 4,5 à 8,5 nm) et ceci uniquement dans les zones du biofilm les plus homogènes (zone 1 du biofilm). Aucune courbe de corrélation n'a été obtenue pour ces molécules dans les zones 2 et 3 du biofilm. Les courbes obtenues pour les FITC-dextran de 150 kDa (8,5 nm de rayon) sont représentées sur la figure III.6.8.

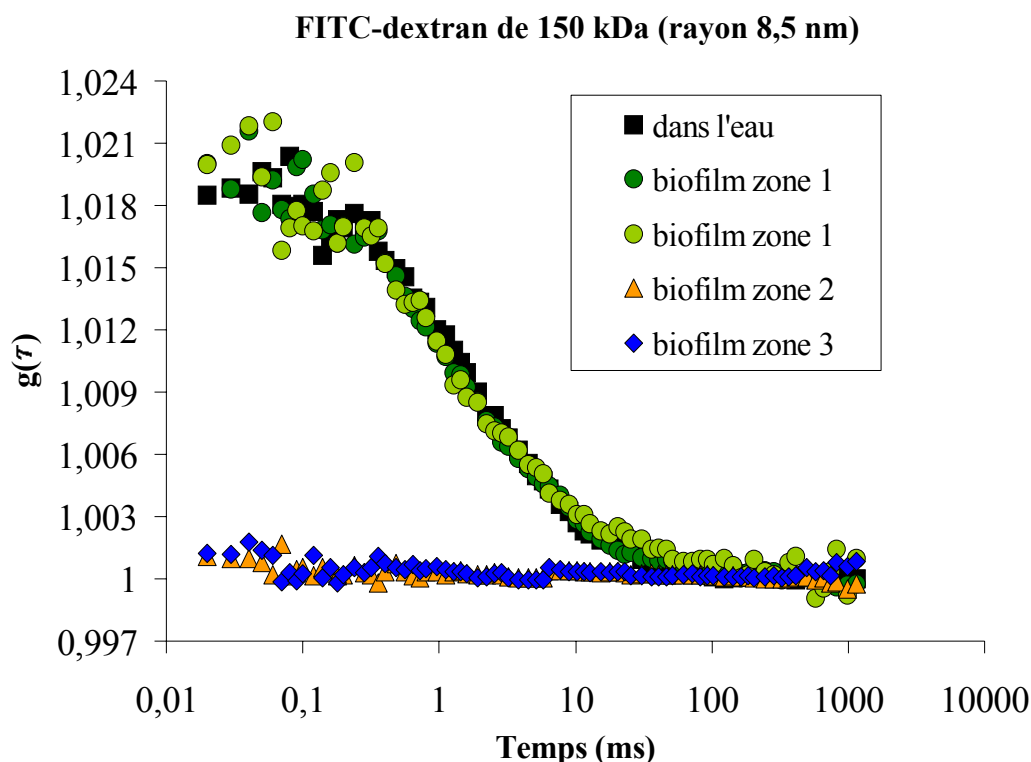


Figure III.6.8: courbes de corrélation de fluorescence des molécules de FITC-dextran de 150 kDa dans un biofilm de *S. maltophilia*. Les courbes acquises en différents points du biofilm sont comparées avec celle obtenue précédemment dans l'eau.

(2) Les courbes de corrélation de fluorescence obtenues dans les biofilms de *S. maltophilia* commencent à présenter des distorsions pour des particules de 14 nm de rayon. En effet, les courbes de corrélation obtenues pour les billes de latex fluorescentes de 14 nm de rayon (figure III.6.9) présentent de légères distorsions dans les zones les plus homogènes (zone 1). Les déformations des courbes s'aggravent suivant la compacité du milieu c'est-à-dire suivant la concentration de la zone sondée en polymères exocellulaires. Ainsi, des déformations importantes apparaissent dans les courbes acquises dans les structures moyennement denses (zone 2). D'autre part, les différences observées dans les courbes acquises à différents points de la même structure confirment la très grande hétérogénéité du biofilm. Finalement, aucune courbe de corrélation n'a pu être obtenue pour ces billes dans les structures « en champignon » (zone 3).

Concernant les billes de latex de plus gros diamètre (110 nm), l'obtention de courbe de corrélation ne fut possible que dans les zones les plus homogènes (zone 1) avec cependant de très grosses distorsions.

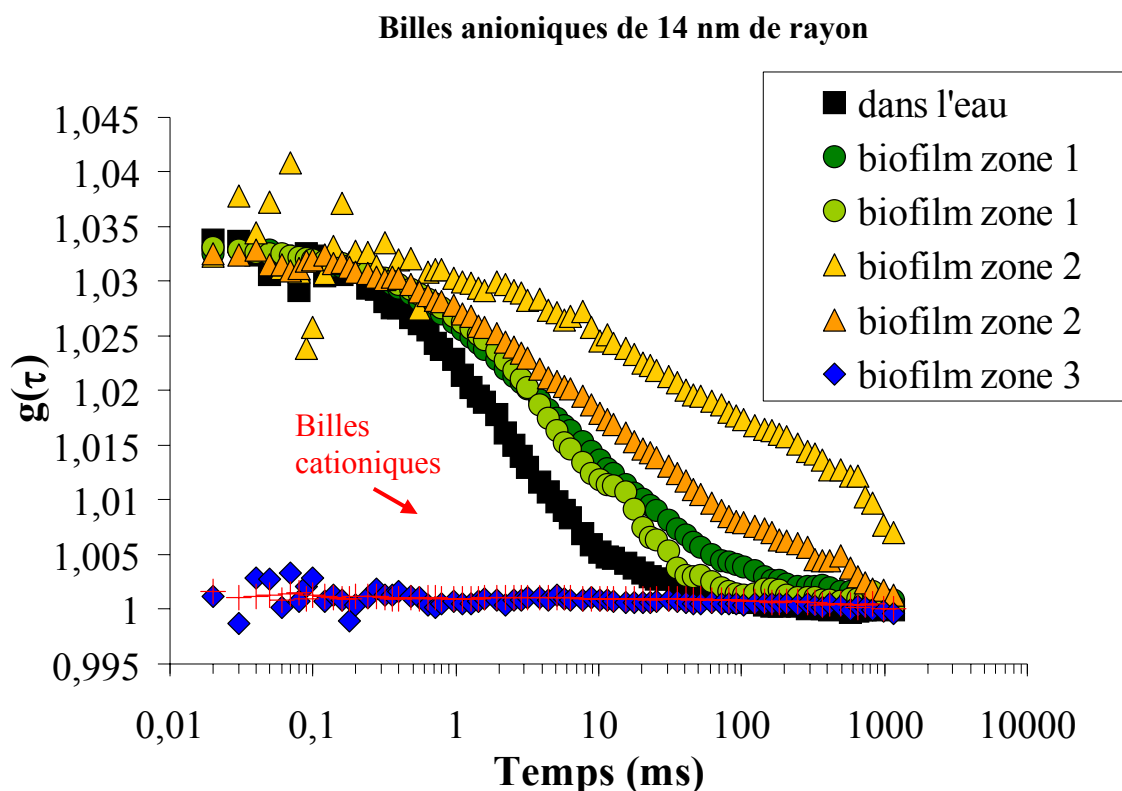


Figure III.6.9 : courbes de corrélation de fluorescence des billes de latex anioniques de 14 nm de rayon dans un biofilm de *S. maltophilia*. Les courbes acquises dans les trois types de zones caractéristiques du biofilm sont comparées avec celle obtenue précédemment dans l'eau. Aucun signal de corrélation n'a été obtenu pour les billes de latex cationiques de 13 nm de rayon.

(3) Comme dans le cas des biofilms de *L. lactis*, aucune corrélation n'a été observée pour les billes de latex fluorescentes chargées positivement dans les biofilms de *S. maltophilia* (figure III.6.9) et ceci quelque soit le type de structure locale sondée.

III.6.3.3. Interprétation des résultats et discussion.

Comme mentionné précédemment (paragraphe III.6.1), très peu d'études se sont attachées à étudier la diffusion en fonction de la structure locale des biofilms bactériens faute d'outils méthodologiques. Le travail de cette thèse représente une première utilisation de la MCF sous EDP pour l'étude de la diffusion moléculaire au sein de biofilms de structures variées. Les processus de diffusion moléculaire au sein des biofilms ont été caractérisés grâce à la comparaison des courbes de corrélation de fluorescence mesurées sur des sondes en solution avec celle obtenues sur ces mêmes sondes introduites dans les biofilms. Les mesures réalisées dans les biofilms ont montré l'existence de trois catégories de courbes:

- 1) des courbes de corrélation de fluorescence identiques à celles obtenues dans l'eau,
- 2) des courbes de corrélation de fluorescence présentant de fortes distorsions,
- 3) une absence de signal de corrélation de fluorescence.

Ces trois catégories de courbes seront ici discutées afin de mettre en évidence d'une part, le rôle de la structure du biofilm et notamment de la présence de polymères extracellulaires sur le processus de diffusion, et d'autre part, le rôle des interactions électrostatiques entre les particules diffusantes et les constituants du biofilm.

Courbes de corrélation de fluorescence identiques à celles obtenues dans l'eau.

Pour chacun des deux biofilms étudiés, des courbes de corrélation de fluorescence de particules au sein du biofilm superposables à celles obtenues dans l'eau ont été obtenues, résultat révélant des possibilités de diffusion et de pénétration des particules fluorescentes dans les biofilms sans aucune difficulté. Quelle que soit la profondeur et la position testée, dans les biofilms de *L. lactis*, des coefficients de diffusion identiques à ceux mesurés dans l'eau pure (figure III.6.6) sont obtenus pour des particules anioniques de rayon inférieur à 55 nm. Des résultats similaires ont été obtenus dans les biofilms de *S. maltophilia* mais uniquement pour des particules anioniques de rayon inférieur à 14 nm et ce dans les zones les plus homogènes (figure III.6.9, zone 1). Ce résultat met en évidence la limite à la diffusion engendrée par la présence des polymères extracellulaires dans la matrice du biofilm.

Nous noterons que les images des différents biofilms obtenues par MEB laissent apparaître des espaces inter-bactéries d'environ 1 μm . Ainsi, on aurait pu s'attendre à obtenir des courbes de corrélation de fluorescence identiques à celles obtenues dans l'eau pour des particules fluorescentes de plus grandes tailles. Cependant, ces espaces relativement larges pourraient être une conséquence structurale de la déshydratation des biofilms (requis pour les mesures en MEB) et ne pas exister pour un système hydraté.

Nous préciserons d'autre part que cette diffusion libre des particules fluorescentes montre que la viscosité locale des biofilms de *L. lactis* et la zone I des biofilms de *S. Maltophilia* n'est pas modifiée par rapport à celle de l'eau.

Courbes de corrélation de fluorescence présentant des distorsions.

Bien qu'il n'y ait pas de changement de viscosité au sein des biofilms de *L. lactis*, les courbes de corrélation de fluorescence mesurées pour les billes de latex anioniques de 55 nm de rayon présentent de très fortes distorsions par rapport à celles obtenues dans l'eau (figure III.6.7). Ce résultat ne peut s'interpréter que comme une gêne stérique à la diffusion de ces particules au sein du biofilm, l'espace inter-bactéries étant trop restreint pour permettre la diffusion libre d'entités de cette taille.

Des distorsions semblables ont été observées lors des mesures sur les billes de latex anioniques de 14 nm de rayon dans les biofilms de *S. maltophilia* (zones 1 et 2) (figure III.6.9). Étant donné la présence de polymères extracellulaires, on aurait pu s'attendre à une viscosité plus grande dans ces biofilms. Nous avons déjà montré que ce n'était pas le cas dans la zone 1. D'autre part, les courbes de corrélation de fluorescence mesurées dans la zone 2 ne sont pas superposables à celles obtenues en solution dans des milieux de viscosité contrôlée (figure III.4.3). Ainsi, les distorsions observées ne peuvent être uniquement induites par un changement de la viscosité du milieu. Les courbes sont complexes et reflètent une diffusion en milieu hétérogène. De plus, au sein des biofilms de *S. maltophilia*, on peut observer que ces distorsions augmentent avec la compacité du milieu mettant une fois de plus en évidence l'influence des polymères extracellulaires dans le processus de diffusion.

Absence de signal de corrélation de fluorescence.

En ce qui concerne l'absence de signal de corrélation de fluorescence, deux explications sont possibles : soit une inhibition de la diffusion, soit une atténuation, voire disparition de la fluorescence des particules due à une interaction spécifique de celles-ci avec un des constituants du biofilm.

Aucun signal de corrélation de fluorescence n'a été mesuré avec les billes de latex cationiques ($R = 13$ nm) au sein des deux types de biofilms, contrairement aux résultats obtenus pour les particules anioniques de taille équivalente. Ce résultat met en évidence le rôle des interactions électrostatiques au sein des biofilms. On peut raisonnablement proposer que l'interaction entre les charges positives des billes de latex et les charges négatives des bactéries de *L. lactis* et *S. maltophilia* (charge contrôlée par les mesures de mobilité électrophorétique) inhibe toute possibilité de diffusion au sein du biofilm. Ainsi, les biofilms étudiés semblent jouer un rôle de barrière de diffusion vis-à-vis des particules positivement chargées.

Une absence de signal de corrélation a également été constatée dans les structures tridimensionnelles en « champignon » (zone 3) du biofilm de *S. maltophilia* pour toutes les billes de latex anioniques. Une interaction entre ces billes et les constituants du biofilm est peu probable puisque les fluorophores sont piégés à l'intérieur des microsphères ce qui limite fortement leur capacité à interagir avec leur environnement. Cette hypothèse est confirmée par l'existence de signal de corrélation dans les zones 1 et 2 des biofilms. Ainsi, l'absence de signal de corrélation de ces microsphères traduit incontestablement leur incapacité à diffuser dans les structures du biofilm « en champignon ».

Les résultats obtenus pour les molécules de FITC-dextran dans les biofilms de *S. maltophilia*, comparés à ceux obtenus pour les billes de latex anioniques de 14 nm de rayon dans ces mêmes biofilms ont par ailleurs attiré notre attention. En effet, des courbes de corrélation ont été obtenues pour ces billes de latex dans les zones moyennement denses du biofilm (zone 2), alors qu'aucun signal n'a pu être enregistré dans ces mêmes structures pour les molécules de FITC-dextran, négativement chargées et de plus petite taille. Cette absence de corrélation pourrait alors être la conséquence d'une interaction des molécules de FITC-dextran avec les constituants du biofilm et plus particulièrement avec les polymères extracellulaires. Pour vérifier ce point, nous avons procédé à l'acquisition de déclin de fluorescence (figure III.6.10) sur des mélanges FITC/xanthane et FITC-dextran/xanthane (le xanthane est le composé sécrété par les bactéries de *S. maltophilia* lors de la formation des biofilms). La technique d'acquisition des déclins de fluorescence et de détermination des durées de vie de fluorescence est exposée dans le chapitre IV qui présente spécifiquement ce type d'études.

Les déclins de fluorescence obtenus ainsi que les valeurs des durées de vie déterminées (tableau III.6.4) montre tout d'abord que les propriétés de fluorescence du FITC ne sont pas affectées par la présence de xanthane. Par contre, les déclins de fluorescence du FITC-dextran en présence de xanthane et du FITC-dextran seul s'avèrent très différents. De plus, l'analyse du déclin caractérisant le mélange FITC-dextran / xanthane montre l'existence de deux

composantes de durées de vie nanosecondes, plus courtes et d'amplitudes différentes de celles caractérisant le FITC-dextran seul. Nous pouvons déduire de ce résultat l'existence d'une interaction spécifique entre le dextran et les molécules de xanthane.

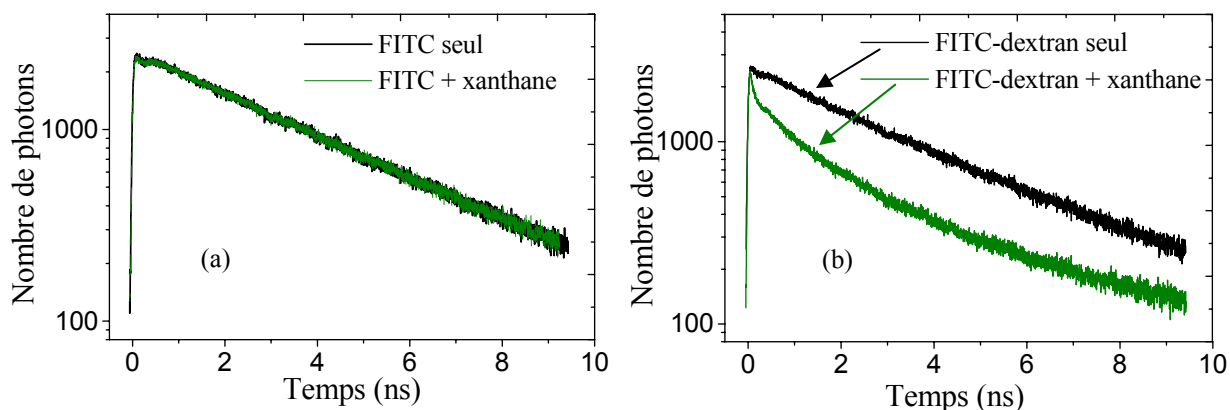


Figure III.6.10 : déclins de fluorescence enregistrés sur des solutions **(a)** de FITC et d'un mélange FITC + xanthane, **(b)** de FITC-dextran seul et d'un mélange FITC-dextran + xanthane.

	A_1 (%)	τ_1 (ns)	A_2 (%)	τ_2 (ns)
FITC	100	$3,8 \pm 0,2$	-	-
FITC+xanthane	100	$3,8 \pm 0,2$	-	-
FITC-dextran	90	$3,8 \pm 0,2$	10	$1,2 \pm 0,2$
FITC-dextran +xanthane	55	$2,9 \pm 0,2$	45	$0,9 \pm 0,2$

Tableau III.6.4 : durées de vie de fluorescence et amplitudes (A_i , $i=1,2$) de chaque composante mesurées pour les molécules de FITC et FITC-dextran et pour des mélanges FITC + xanthane et FITC-dextran + xanthane.

Nous n'avons pas ici cherché à déterminer plus précisément l'origine et la nature de cette interaction. Néanmoins, ces résultats constituent une base certaine pour l'explication de l'absence de corrélation observée pour les particules de FITC-dextran dans les zones 2 et 3 du biofilm de *S. maltophilia*.

Impact biologique de ces résultats.

En absence de toute interaction électrostatique, nos résultats montrent que bon nombre d'entités peuvent pénétrer et diffuser dans l'épaisseur des structures constituant les biofilms de bactéries même si la diffusion est parfois gênée. Ainsi, d'un point de vue de l'encombrement stérique, rien ne s'oppose dans les zones de biofilms pauvres en composés exopolymériques à la diffusion de nutriments, d'agents antimicrobiens, voire même de

certain agents biologiques tels que de petits bactériophages (taille inférieure à 0,1 μm) ou de virus. Par exemple, certains bactériophages sont indésirables dans l'industrie laitière, en raison de leur action destructrice des bactéries utilisées pour le processus de fermentation [Brüssow 2001]. Considérant nos résultats, les possibilités de pénétration de bactériophages au sein de biofilm de *L. lactis* sont démontrées. L'infection des biofilms par cette entité biologique qui peut alors se développer et contaminer une production lors du processus d'érosion du biofilm est alors probable et pourrait expliquer certains échecs du processus de fermentation parfois observé lors de la fabrication de produit laitiers.

Lorsque l'encombrement stérique n'apparaît pas comme un facteur limitant à la diffusion, celle-ci peut être perturbée par des interactions physico-chimiques entre les particules diffusantes et les constituants du biofilm. Nos résultats ont montré l'inhibition de la diffusion de particules chargées positivement au sein des biofilms globalement chargés négativement. Par ailleurs, Huang *et al.* [Huang 1995] ont constaté que l'action de molécules désinfectantes de monochloramine (molécules positivement chargées) était limitée à la surface des biofilms. Cette influence des interactions électrostatiques dans la diffusion intra-biofilm a par ailleurs déjà été suggérée par plusieurs auteurs [Allison 2000, Stoodley 1994, Bryers 1998]. Ainsi, le choix d'une molécule désinfectante devrait tenir compte de sa charge et de celle de la cible à désinfecter afin d'optimiser son efficacité.

La taille des particules utilisées lors de nos études par MCF sous TPE étant largement supérieure à celle de la plupart des agents antimicrobiens, il est difficile, par notre méthode, de confirmer de manière absolue l'hypothèse de barrière à la diffusion de ces molécules jouée par la présence de polymères extracellulaires. Cependant la très grande spécificité des propriétés de la diffusion observée dans les structures « en champignon » des biofilms laisse présager d'une hétérogénéité de réaction aux agents anti-microbiens. Davies *et al.* [Davies 1998] ont ainsi démontré que la forte résistance à un biocide chimique de *P. aeruginosa* POA1 était associée à la formation de ce type de structure tridimensionnelle. Briandet *et al.* [Briandet 1999] ont également observés que, seules les structures « en champignons » riches en composés extracellulaires permettaient un développement microbien malgré l'action quotidienne d'un désinfectant. Ainsi, l'ensemble de ces résultats indiquent que ces structures « en champignon » agissent comme une barrière à la diffusion moléculaire, même pour des entités aussi petite que des agents antimicrobiens.

En conclusion, considérant les avantages de l'EDP pour l'étude d'échantillons biologiques et les faibles concentrations en fluorophores requises en MCF, l'utilisation combinée de ces deux techniques apparaît comme un outil puissant et bien approprié à l'étude du processus de diffusion moléculaire au sein de biofilms bactériens. Cette étude offre de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension des propriétés physiologiques spécifiques des biofilms de bactéries afin de mieux contrôler leur développement.

III.7. Conclusion et perspectives

La technique de MCF sous EDP que nous avons mise au point dans le cadre de notre projet de réalisation d'un dispositif complet de microscopie de fluorescence par excitation à deux photons a répondu à toutes nos attentes. Les mesures effectuées sur des molécules en solution prouvèrent les performances et la validité de notre technique en terme de détermination précise de coefficients de diffusion moléculaire et de sensibilité de détection extrême permettant des mesures sur des fluorophores uniques en solution. Les capacités de notre système ont finalement été testées par une application en milieu biologique vivant. Les avantages de la technique de MCF alliée à l'EDP qui permet des mesures non perturbatrices et peu destructrices en milieu biologique ont été mis à profit avec succès. L'étude des mécanismes de diffusion moléculaires au sein de biofilm bactériens, pour la première fois réalisées en MCF sous EDP, fut en effet parfaitement concluante.

Notre dispositif est cependant à ce jour limité à l'étude de comportements diffusionnels uniquement. Pour pallier à ce problème, deux projets de développement de notre instrumentation sont envisagés. Tout d'abord, l'acquisition d'une carte commerciale (Flex2K-12x2 correlator, correlator.com) pour l'enregistrement des données et le calcul des courbes de corrélation vient d'être effectuée. L'intégration de ce matériel dans notre dispositif actuel permettra une acquisition plus rapide des courbes de corrélation comparée à notre procédé de calcul de celles-ci par notre programme informatique. Les mesures de corrélation aux temps courts seront ainsi plus aisées.

D'autre part, une évolution de notre système vers la technique de corrélation croisée est prévue. Cette technique utilise deux détecteurs identiques avec deux possibilités d'application. La première [Widengren 1998] consiste à séparer le signal de fluorescence émis par une seule variété de fluorophores en deux signaux identiques détectés par chacun des deux détecteurs. Ce mode d'utilisation permettra de s'affranchir de la corrélation « parasite » que

nous avons par exemple observée aux temps courts sur les molécules de GFP et de fluorescéine. L'acquisition de courbes de corrélation sur des temps inférieurs à la microseconde sera alors possible pour l'analyse de divers processus dynamiques tels que des processus de protonations-déprotonations [Widengren 1999], ou d'interactions des fluorophores avec leur environnement [Widengren 1995]. Un second mode d'utilisation de la technique de corrélation croisée est basé sur la détection séparée des signaux de fluorescence émis par deux variétés de fluorophores [Schwille 1997] et permet de suivre simultanément les processus réactionnels de ces deux composés.

Grâce à ces projets d'évolution, un domaine d'applications vaste et varié sera accessible par notre technique de microscopie de corrélation de fluorescence sous excitation à deux photons.

Chapitre IV

Mise en place et applications de l'imagerie de durées de vie de fluorescence sous EDP

Ce chapitre concerne la deuxième méthode d'analyse dynamique de l'émission de fluorescence développée dans le cadre de notre projet de microscopie de fluorescence par excitation à deux photons (EDP) : la mesure et l'imagerie de durées de vie de fluorescence. Nous présenterons un premier système expérimental développé dans ce but, basé sur la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps (CPUT). Nous montrerons ensuite les capacités de ce dispositif pour la détermination de durées de vie de fluorescence sur des molécules en solution et en milieu cellulaire. Plus précisément, notre technique a été appliquée à l'étude de la réactivité de deux molécules médicaments dans un contexte d'applications à la pharmacologie.

Une première étude que nous présenterons a été effectuée *in vitro* sur la camptothécine, molécule antitumorale. La mesure de durée de vie de fluorescence a été appliquée à l'étude de l'interaction de la camptothécine avec la topoisomérase I, enzyme qui agit spécifiquement sur l'ADN lors de sa réplication et qui semble intervenir dans l'action antitumorale de ce médicament.

Une deuxième étude a été amorcée sur une molécule inhibitrice du VIH : la KHD161. Nous avons étudié par imagerie de l'intensité de fluorescence les possibilités de pénétration de ce médicament, qui étaient jusqu'à présent inconnues, en milieu cellulaire. L'analyse des durée de vie de cette molécule introduite dans les cellules a d'autre part été effectuée avec de premiers tests d'imagerie des durées de vie de fluorescence.

Nous terminerons ce chapitre par une présentation des perspectives de développement envisagées autour de notre montage actuel.

IV.1. Dispositif expérimental pour la mesure et l'imagerie de durées de vie de fluorescence.

Dans une première partie, nous décrirons le montage expérimental mis en place pour les mesures de durées de vie de fluorescence basé sur la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps (CPUT). Une deuxième partie traitera de l'analyse des données expérimentales et de la détermination des durées de vie de fluorescence. Une troisième partie de ce paragraphe décrira le système complet d'imagerie mis en place pour les études d'échantillons biologiques

IV.1.1. Dispositif expérimental pour la mesure de durées de vie de fluorescence.

Notre montage expérimental pour la détermination des durées de vie de fluorescence par comptage de photons uniques corrélés en temps (CPUCT) est présenté sur la figure IV.1.1.

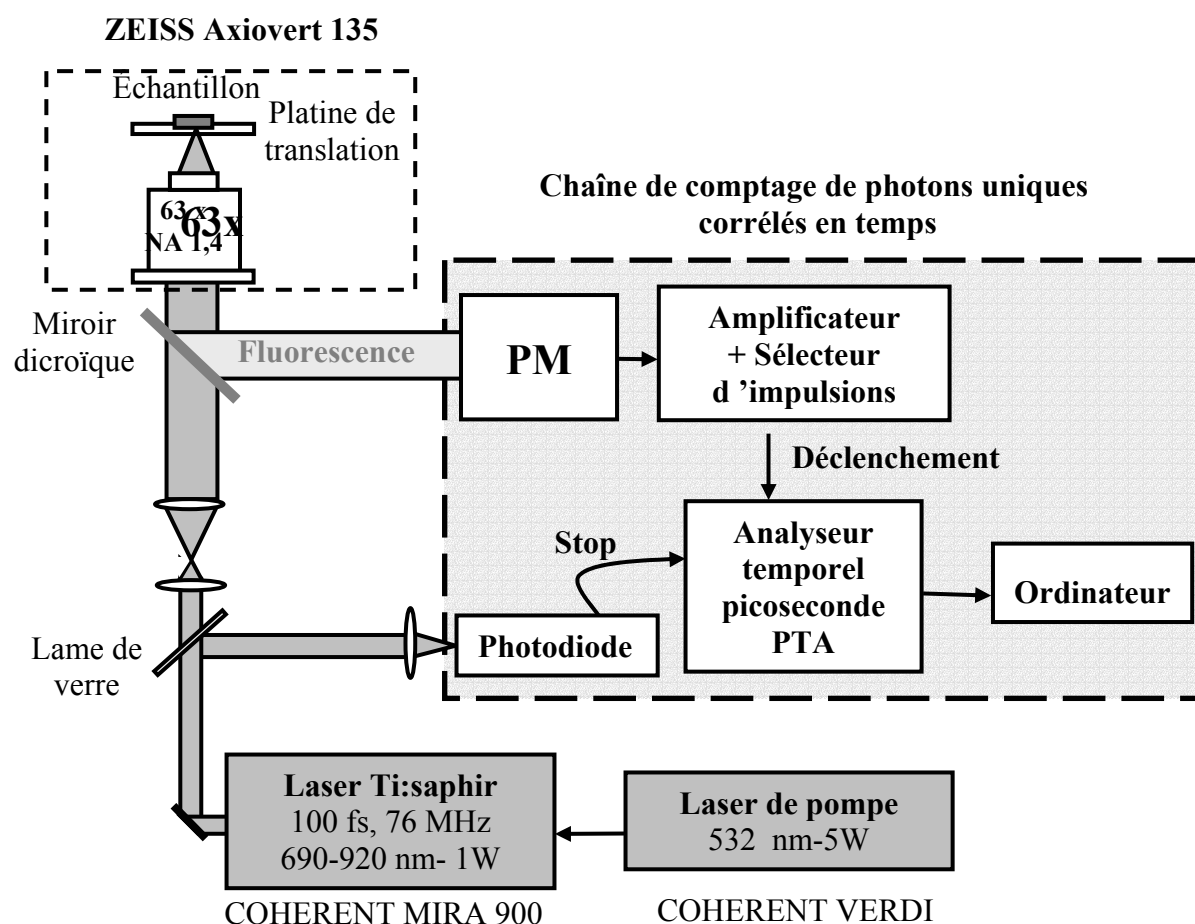


Figure IV.1.1 : schéma du dispositif expérimental de CPUCT adapté à notre microscope de fluorescence par EDP.

Ce dispositif est basé sur le même montage optique (lasers et microscope) que celui utilisé en corrélation de fluorescence (Chapitre III). Toutefois, nous avons choisi pour des raisons de simplicité du montage, d'éliminer le système de prismes pour la pré-compensation de la dispersion de la vitesse de groupe. En effet, les mesures de durées de vie de fluorescence s'effectuent généralement sur des concentrations de fluorophores plus élevées que dans le cas de la microscopie de corrélation de fluorescence (typiquement supérieures à quelques centaines de nanomoles/l). Dans ce cas, la perte d'efficacité d'excitation biphotonique et donc

la perte d'émission de la fluorescence (bien qu'estimée à 50 %, Chapitre II, paragraphe I.3.3), n'est pas handicapante.

Notre microscope de fluorescence par EDP est associé à un système de CPUCT permettant l'acquisition de déclins de fluorescence selon le principe exposé au paragraphe I.5.2. Ce système est composé de plusieurs éléments électroniques caractérisés par des temps de réponse rapides (quelques dizaines de picosecondes) et spécifiques de ce type d'applications. La détection de la fluorescence s'effectue grâce à un photomultiplicateur (PM) à galette de microcanaux (R3809U-52, Hamamatsu) caractérisé par un gain élevé (2×10^5 sous une tension d'alimentation de 3000 V), une sensibilité de la photocathode maximale de 200 nm à 600 nm et quasiment nulle pour les longueurs d'onde supérieures à 750 nm (figure IV.1.2) ce permet permet la détection exclusive des signaux de fluorescence sans perturbation par le faisceau laser excitateur. Les éventuels résidus d'infrarouge détectés sont, comme dans le cas de la MCF, éliminés grâce à l'utilisation de filtres passe-bas appropriés.

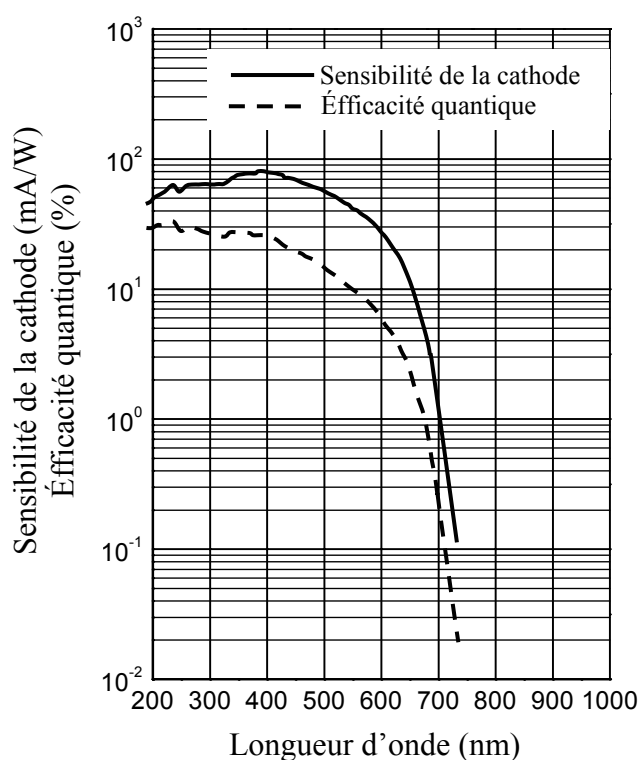


Figure IV.1.2 : réponse spectrale du photomultiplicateur Hamamatsu R3809U-52.

De plus, le courant d'obscurité émis par ce PM est extrêmement faible ($75 \mu\text{A}$) et correspond à un bruit d'obscurité maximal de 200 cps/s. Ce type de PM à galette de microcanaux est par ailleurs particulièrement bien adapté aux mesures de déclins de fluorescence par CPUCT en raison de leur temps de réponse très court. Notre PM émet en effet, pour chaque photon

détecté, une impulsion standard NIM caractérisée par un temps de montée de 150 ps et d'une largeur à mi-hauteur d'environ 300 ps.

Le PM est relié à un amplificateur et sélecteur d'impulsions électroniques (Amplifier and Timing Discriminator modèle 9327, EG&G Ortec), adapté à l'utilisation de détecteurs ultra-rapides. Ce modèle accepte en entrée des impulsions NIM de largeur variant de 250 ps à 5 ns, mais est optimisé pour des impulsions sub-nanosecondes (minimisation du bruit et de la dérive temporelle pour des impulsions de durée proche de 250 ps). Pour notre application, l'amplificateur sera utilisé dans la gamme de gain 0-30 mV (une autre gamme : 0-150 mV est disponible). Le sélecteur d'impulsions sert alors à trier les impulsions amplifiées selon leur amplitude. Par réglage d'un seuil en tension, toutes les impulsions dont l'amplitude est inférieure à ce seuil correspondant au bruit sont éliminées. D'un point de vue pratique, la valeur de ce seuil a été réglée de manière à minimiser le bruit d'obscurité du PM (taux de comptage < 20 coups/s).

Chaque impulsion électronique correspondant à la détection d'un photon de fluorescence, après avoir subi cette mise en forme (amplification et sélection) sert de signal de déclenchement d'un analyseur en temps picoseconde (Picosecond Time Analyzer que nous appellerons PTA, modèle 9308, EG&G Ortec). Préalablement, le train d'impulsions du laser a été détecté au moyen d'une photodiode rapide (temps de réponse < 1 ps) reliée elle aussi à un sélecteur d'impulsions rapide (Pico-Timing Discriminator modèle 9307, EG&G Ortec) qui permet d'éliminer les impulsions de bruit. Ce signal sert alors de signal d'arrêt pour le PTA. Le décalage temporel Δt entre la détection d'un photon de fluorescence par le PM et l'arrivée d'une impulsion laser est ainsi mesuré et l'histogramme du nombre de photons détectés pour chaque valeur de ce décalage Δt est construit grâce à un logiciel fourni avec le PTA. Plus précisément, chaque photon détecté sera classé dans un intervalle temporel (ou canal) dont la largeur peut être choisie par l'utilisateur (durées des canaux de 1,221 ps à 2,500 ns). Expérimentalement, la valeur de cette durée sera choisie en fonction de la précision désirée lors de l'acquisition des déclin de fluorescence. Par exemple, la détermination de durées de vie de fluorescence de quelques dizaines de picosecondes nécessitera l'utilisation de canaux de quelques picosecondes de durée. Néanmoins, une durée des canaux d'acquisition très courte impose un nombre total de canaux très grand pour la construction de l'histogramme ce qui pourra être handicapant lors du traitement des données. La durée totale d'acquisition d'un déclin de fluorescence sera dans notre cas limitée par le temps séparant l'arrivée de deux

impulsions laser consécutives c'est-à-dire à environ 13 ns et nous nous limiterons à une durée minimale de 2,44 ps ce qui correspond à un déclin de fluorescence constitué d'environ 5300 composantes.

Les méthodes d'acquisition de la réponse instrumentale qui correspond au profil temporel des impulsions laser vu par la chaîne électronique de comptage, et définit la résolution temporelle de notre système sont présentées dans le paragraphe suivant.

IV.1.2. Traitement des données expérimentales.

IV.1.2.1. Principe.

Le déclin de fluorescence enregistré suite à l'excitation de molécules par une impulsion laser très courte est défini comme la convolution du déclin réel de la fluorescence avec la réponse instrumentale du système de détection [O'Connor 1984a]:

$$I_{\text{exp}}(t) = \int_0^t R(t')I(t-t')dt', \quad (\text{IV.1.1})$$

où $I_{\text{exp}}(t)$ désigne le déclin de fluorescence expérimental enregistré, $R(t)$ est la réponse instrumentale et $I(t)$ est le déclin de fluorescence réel.

Ainsi, le déclin de fluorescence enregistré est déformé par la réponse instrumentale du système de détection. Nous noterons que la réponse instrumentale n'affecte pas le déclin aux temps longs et que la détermination de durées de vie longues (> 1 ns) peut dans ce cas s'effectuer par analyse directe du déclin de fluorescence expérimental. Néanmoins, la détermination précise et fiable de durées de vie de fluorescence de l'ordre de la dizaine picosecondes impose la prise en compte de cette convolution. D'autre part, l'utilisation d'une procédure de déconvolution du déclin expérimental avec la réponse instrumentale permet d'améliorer de façon indirecte la résolution temporelle du système de CPUCT. Typiquement, il est possible par ce moyen d'extraire des déclins de fluorescence des durées de vie de 10 à 20 ps.

Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser une procédure de traitement des déclins expérimentaux basée sur la déconvolution de la réponse instrumentale du système de CPUCT

avec le déclin de fluorescence enregistré. La procédure d'analyse des données fait alors appel à une fonction $J(t)$ définie par :

$$J(t) = \int_0^t R(t') I_{th}(t - t') dt', \quad (IV.1.2)$$

où $I_{th}(t)$ est une fonction modèle décrivant le profil théorique des déclins de fluorescence.

En théorie, l'intensité de fluorescence émise par une molécule décroît de manière exponentielle avec le temps et le déclin de fluorescence s'exprime de la manière suivante :

$$I_{th}(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right), \quad (IV.1.3)$$

où I_0 représente l'amplitude du déclin au temps 0 et τ_F la durée de vie de fluorescence de l'échantillon étudié.

Toutefois, la plupart des déclins de fluorescence ne sont généralement pas monoexponentiels en raison de la présence simultanée de différentes espèces moléculaires. Nous avons donc choisi d'utiliser comme modèle théorique des déclins de fluorescence, une série d'exponentielles de type :

$$I_{th}(t) = \sum_{i=1}^{n_{ex}} a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Fi}}\right), \quad (IV.1.4)$$

où n_{ex} est le nombre total d'exponentielles, et a_i représente le poids de la composante de durée de vie τ_{Fi} .

Le traitement des données requiert tout d'abord l'acquisition d'une réponse instrumentale. La détermination des durées de vie de fluorescence s'effectue ensuite par calcul, selon l'équation IV.1.2, de la convolution $J(t)$ de la réponse instrumentale avec le profil théorique du déclin de fluorescence puis par l'ajustement de cette fonction $J(t)$ avec le déclin expérimental $I_{exp}(t)$ enregistré.

IV.1.2.2. Acquisition de la réponse instrumentale de notre système de CPUCT sous une EDP.

En théorie, la validité des procédures d'analyse des données utilisant une déconvolution du déclin avec la réponse instrumentale requiert l'acquisition des deux courbes dans les mêmes conditions expérimentales. Sous une excitation monophotonique, la réponse

instrumentale du système de détection est couramment et facilement enregistrée en remplaçant l'échantillon fluorescent utilisé pour l'acquisition du déclin d'une solution diffusante de Ludox (solution diffusante à base de particules de silice en suspension dans un milieu aqueux) dont on fait varier la concentration selon l'intensité de lumière diffusée désirée. La réponse instrumentale est alors enregistrée, dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour l'acquisition des déclins de fluorescence, en détectant l'intensité excitatrice diffusée par cette solution [O'Connor 1984a].

Par contre, dans le cas d'une excitation à deux photons, l'enregistrement de la réponse instrumentale par détection de la lumière diffusée devient problématique en raison de la sensibilité quasiment nulle des détecteurs à la longueur d'onde d'excitation. Nous proposons ici deux méthodes que nous avons employées pour l'enregistrement de la réponse instrumentale de notre système de CPUCT .

L'acquisition de la réponse instrumentale du système de CPUCT peut s'effectuer en disposant sous microscope un cristal non linéaire doubleur de fréquences (figure IV.1.3). La réponse instrumentale est alors enregistrée en détectant l'onde de seconde harmonique générée, émise à une longueur d'onde moitié de celle de l'excitation (entre 345 nm et 500 nm selon la longueur d'onde d'excitation choisie).

La réponse instrumentale présente deux maxima, l'un au temps 0, correspondant à la détection de l'impulsion laser, et l'autre à environ 400 ps caractéristique de la réponse du PM. Nous noterons que l'amplitude de ce maximum secondaire paraît élevée en raison de la représentation en échelle logarithmique mais reste négligeable par rapport à l'amplitude du pic principal (amplitude du pic principal / amplitude du pic secondaire < 100).

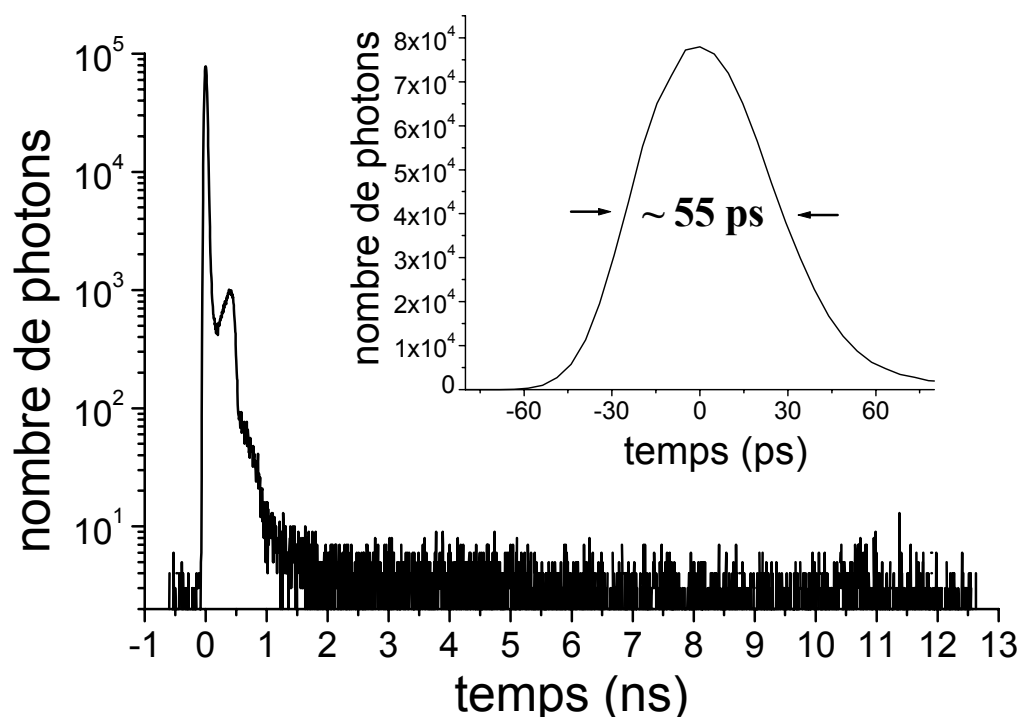


Figure IV.1.3 : réponse instrumentale de notre système de CPUT obtenue en utilisant un cristal non linéaire doubleur de fréquence. Un agrandissement du pic principal représenté en échelle linéaire montre une résolution temporelle d'environ 55 ps.

Bien que les longueurs d'onde du signal doublé en fréquence se situent dans la gamme de sensibilité maximale de la cathode de notre PM, le procédé d'acquisition de la réponse instrumentale au moyen d'un cristal doubleur de fréquences présente plusieurs inconvénients.

1- Nous avons utilisé dans notre cas un cristal de BBO ($\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$) taillé pour un accord de phase de type I et pour la longueur d'onde 800 nm. L'efficacité du doublage de fréquence n'est donc optimale que pour cette longueur d'onde et sera fortement réduite lors de changements de la longueur d'onde d'émission du laser.

2- L'intensité de l'onde de seconde harmonique générée n'est maximale que pour une orientation du cristal satisfaisant les conditions d'accord de phase. Or, le procédé d'acquisition de la réponse instrumentale consiste ici à déposer simplement le cristal doubleur sur la platine porte-objet du microscope, et une bonne orientation du cristal de manière à respecter les conditions d'accord de phase est difficile à accomplir.

De plus, la très forte divergence du faisceau laser incident due à l'utilisation d'un objectif de grande ouverture numérique ($\text{ON}=1,4$) diminue encore l'efficacité de génération de l'onde du second harmonique (l'accord de phase est critique en angle).

3- Nous avons constaté une dégradation du cristal relativement rapide suite à son excitation répétée par des densités de photons très élevées. En effet, l'utilisation d'un objectif

d'ouverture numérique 1,4 concentre le rayonnement incident dans un volume micrométrique et nous avons pu observer la présence d'impacts sur la surface du cristal. La détermination aussi précise que possible des durées de vie de fluorescence nécessitant un enregistrement fréquent de la réponse instrumentale, le cristal doubleur de fréquence est très vite endommagé sur la majeure partie de sa surface. Nous avons également constaté que cette dégradation s'accompagnait à long terme de distorsions apparentes dans la réponse instrumentale (distorsions probablement dues à des processus de diffusion du faisceau excitateur dans le cristal et se manifestant par un front de montée arrondi, un élargissement de la réponse instrumentale jusqu'à 90 ps et parfois par apparition d'un déclin de fluorescence).

Nous préciserons néanmoins que les courbes de réponses instrumentales étaient parfaitement reproductibles lors de l'utilisation d'un cristal intact. Cependant, en raison des problèmes de dégradation évoqués ci-dessus, l'utilisation d'un cristal non linéaire doubleur de fréquence pour l'enregistrement de la réponse instrumentale du système est à effectuer avec certaines précautions et ne semble pas le procédé le plus adapté pour une utilisation fréquente.

Une deuxième méthode pour l'acquisition de la réponse instrumentale consiste à détecter un résidu de lumière infrarouge renvoyée vers le PM. Pour cela, l'échantillon fluorescent placé sous microscope pour l'acquisition du déclin de fluorescence est remplacé par une lamelle de verre qui renvoie quelques pourcents de l'intensité laser incidente à travers l'objectif. Étant donné la sensibilité quasiment nulle de notre PM pour les longueurs d'onde d'émission du laser à saphir dopé au titane, la détection du résidu de lumière infrarouge atteignant le PM nécessite l'élimination des filtres passe-bas placés habituellement devant le détecteur. La réponse instrumentale et les déclins de fluorescence ne seront donc pas enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous préciserons que, contrairement à la méthode utilisant un cristal doubleur de fréquence, ce procédé d'acquisition procure une réponse instrumentale reproductible dans le temps : toutes les réponses instrumentales obtenues de cette manière sont identiques et parfaitement superposables et aucune déformation ni élargissement de celles-ci n'a été observé avec cette méthode. À titre d'indication, la figure IV.1.4 présente une réponse instrumentale acquise suivant cette méthode.

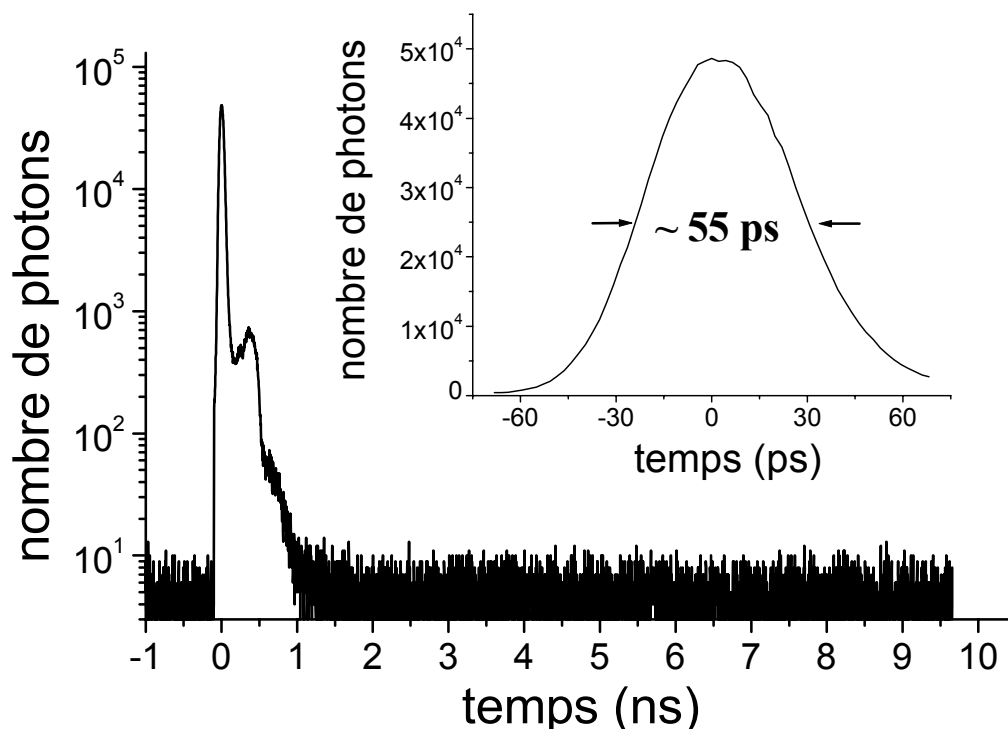


Figure IV.1.4 : réponse instrumentale de notre système de CPUCT acquise en détectant un résidu de lumière infrarouge. L'agrandissement du pic principal représenté en échelle linéaire montre une résolution temporelle d'environ 55 ps, identique à celle obtenue par l'autre méthode d'acquisition.

Pour les différentes applications présentées dans ce chapitre, le traitement des données expérimentales fera appel à une réponse instrumentale acquise par ce procédé.

IV.1.2.3. Détermination des durées de vie de fluorescence.

Le programme informatique de traitement des données utilise une méthode classique de déconvolution du déclin expérimental enregistré avec la réponse instrumentale du système [O'Connor 1979, Eaton 1990].

Ce programme commence par calculer, conformément à l'équation IV.1.2, la convolution $J(t)$ de la réponse instrumentale enregistrée avec la fonction théorique $I_{th}(t)$ décrivant le déclin de fluorescence. Le déclin de fluorescence expérimental et la fonction d'appareil enregistrés se présentant sous la forme d'histogramme, ce calcul s'effectue de manière discrète.

Concernant le déclin de fluorescence, le nombre de photons $N_D(t_i)$ comptés dans le $i^{\text{ème}}$ canal temporel de durée Δt peut s'exprimer sous la forme :

$$N_D(t_i) = \int_{t_i}^{t_i + \Delta t} I_{\text{exp}}(t) dt \approx \Delta t I_{\text{exp}}\left(t_i + \frac{\Delta t}{2}\right). \quad (\text{IV.1.5})$$

De la même façon, la $i^{\text{ème}}$ composante de la réponse instrumentale $N_R(t_i)$ peut s'écrire sous la forme :

$$N_R(t_i) = \int_{t_i}^{t_i + \Delta t} R(t) dt \approx \Delta t R\left(t_i + \frac{\Delta t}{2}\right). \quad (\text{IV.1.6})$$

L'expression théorique du déclin de fluorescence sera échantillonnée de la même manière :

$$I_{\text{th}}(t_i) = \sum_{k=1}^{\text{nex}} a_k \exp\left(-\frac{t_i + \frac{\Delta t}{2}}{\tau_{Fk}}\right). \quad (\text{IV.1.7})$$

Les valeurs de plusieurs paramètres sont alors choisies par l'utilisateur avant le lancement du programme d'analyse des déclins :

- le nombre d'exponentielles **nex** du déclin théorique : nous utiliserons généralement une série de 80 exponentielles,
- la valeur minimale $\tau_{F\text{min}}$ des durées de vie : étant donnée la limite de résolution du système de CPUCT, cette valeur sera toujours supérieure à 10 ps,
- le facteur de croissance **g** : ce facteur sert au calcul des valeurs des durées de vie qui seront prises en compte dans l'équation IV.1.7. Celles-ci sont calculées à partir de la durée de vie minimale précédemment choisie selon la progression suivante :

$$\text{pour } i \text{ variant de } 1 \text{ à } \text{nex} : \tau_{Fi} = \tau_{F1} * g^{i-1}.$$

La valeur de **g** à appliquer est choisie de manière à obtenir une distribution continue de durées de vie et est déterminée en fonction de la durée de vie maximale que l'on désire utiliser lors du traitement. Par exemple, si $\tau_{F1} = 20$ ps, un facteur de croissance de 1,09 conduira à des durées de vie distribuées entre 10 ps et 18 ns,

- le paramètre de translation **tr** : ce paramètre permet d'appliquer une translation temporelle au déclin expérimental ou à la réponse instrumentale de manière à superposer les amplitudes maximales des deux courbes. Un bon ajustement de ce paramètre est important pour un traitement correct des données.

Nous préciserons que les amplitudes a_i des composantes du déclin théorique sont initialement fixées toutes à 1.

Une fois ces paramètres mémorisés, le programme de traitement des données commence par calculer la convolution de la réponse instrumentale enregistrée avec la fonction théorique $I_{th}(t)$ décrivant le déclin de fluorescence.

Suivant les notations de la réponse instrumentale (IV.1.6) et du déclin théorique (IV.1.7), l'expression de cette convolution pour chaque canal de durée Δt est:

$$J(t_i) = \Delta t \int_0^{t_i + \Delta t / 2} R(t') I_{th}(t_i + \frac{\Delta t}{2} - t') dt'. \quad (IV.1.8)$$

Pour le calcul discret, cette équation peut se mettre sous la forme [O'Connor 1984c]:

$$J(t_i) = \Delta t \left[R\left(\frac{\Delta t}{2}\right) I_{th}(t_i) + R\left(t_1 + \frac{\Delta t}{2}\right) I_{th}(t_i - t_1) + \dots \right. \\ \left. + R\left(t_{i-1} + \frac{\Delta t}{2}\right) I_{th}(t_i - t_{i-1}) + R\left(t_i + \frac{\Delta t}{2}\right) I_{th}(0) \right]. \quad (IV.1.9)$$

La convolution du déclin théorique avec la réponse instrumentale du système est ainsi déterminée pour chaque canal de l'histogramme.

Par une méthode mathématique standard d'optimisation (méthode quasi-Newtonienne, [Minoux 1983]), le programme ajuste ensuite cette fonction $J(t_i)$ avec le déclin expérimental en déterminant les valeurs des amplitudes a_i jusqu'à minimisation du paramètre χ^2 défini par :

$$\chi^2 = \frac{1}{n_f - n_1 + 1 - n_{ex}} \sum_{i=n_1}^{n_f} \left\{ \frac{[D_{exp}(t_i) - D(t_i)]^2}{D_{exp}(t_i)} \right\}, \quad (IV.1.10)$$

où n_1 et n_f désignent le premier et le dernier canal de l'histogramme utilisés lors de l'analyse.

Ce processus de minimisation terminé, les valeurs des amplitudes et des durées de vie correspondantes sont mémorisées. Plusieurs critères sont alors utilisés afin de juger la fiabilité des résultats obtenus. Tout d'abord, la valeur de χ^2 doit être proche de 1. Plus précisément, un traitement des données est estimé satisfaisant si cette valeur est comprise entre 0,8 et 1,2.

D'autre part, le calcul des résidus est effectué pour chaque canal selon la relation suivante :

$$\text{res}(t_i) = \frac{D_{\text{exp}}(t_i) - D(t_i)}{\sqrt{D_{\text{exp}}(t_i)}}. \quad (\text{IV.1.11})$$

La représentation des résidus en fonction du temps atteste alors de la fiabilité des résultats obtenus. Les résultats sont jugés satisfaisants si les résidus sont aléatoirement distribués autour de zéro.

IV.1.3. Dispositif expérimental pour l'imagerie.

Parallèlement aux techniques de mesures et d'analyses résolues en temps de la fluorescence, nous avons mis en place un système complet d'imagerie de l'intensité et des durées de vie de fluorescence pour les études d'échantillons biologiques, que nous décrirons dans ce paragraphe.

Les différentes possibilités d'imagerie de notre dispositif expérimental sont représentées sur la figure IV.1.5.

Notre microscope est équipé d'un coulisseau porte-filtres que l'on peut déplacer selon le mode d'imagerie désiré. Plus précisément, ce coulisseau dispose de trois emplacements permettant l'installation de trois jeux de filtres différents. Nous avons dans notre cas installé dans l'un de ces emplacements un miroir large bande (réflexion à 98 % des longueurs d'onde visibles et infrarouges), qui a été utilisé pour toutes les études réalisées sous EDP. Un autre emplacement a été équipé d'un jeu de filtres spécifiques permettant la visualisation de la fluorescence de la molécule de KHD 161 (voir paragraphe ci-dessous : imagerie de la fluorescence sous excitation monophotonique). Le dernier emplacement, qui ne contient aucun filtre ni miroir, est utilisé lors de l'acquisition d'images en transmission.

Imagerie en transmission.

L'imagerie en transmission des échantillons biologiques s'effectue classiquement en utilisant l'illuminateur (lumière blanche, lampe halogène 12 V, 100 W) dont est équipé notre microscope. Le coulisseau porte-filtres du microscope est placé sur la position qui ne contient aucun filtre ni miroir. La lumière transmise est alors détectée par une caméra CCD (Sony modèle XC-77CE, noir et blanc) reliée à une carte d'acquisition d'images (Data Translation, DT 3120).

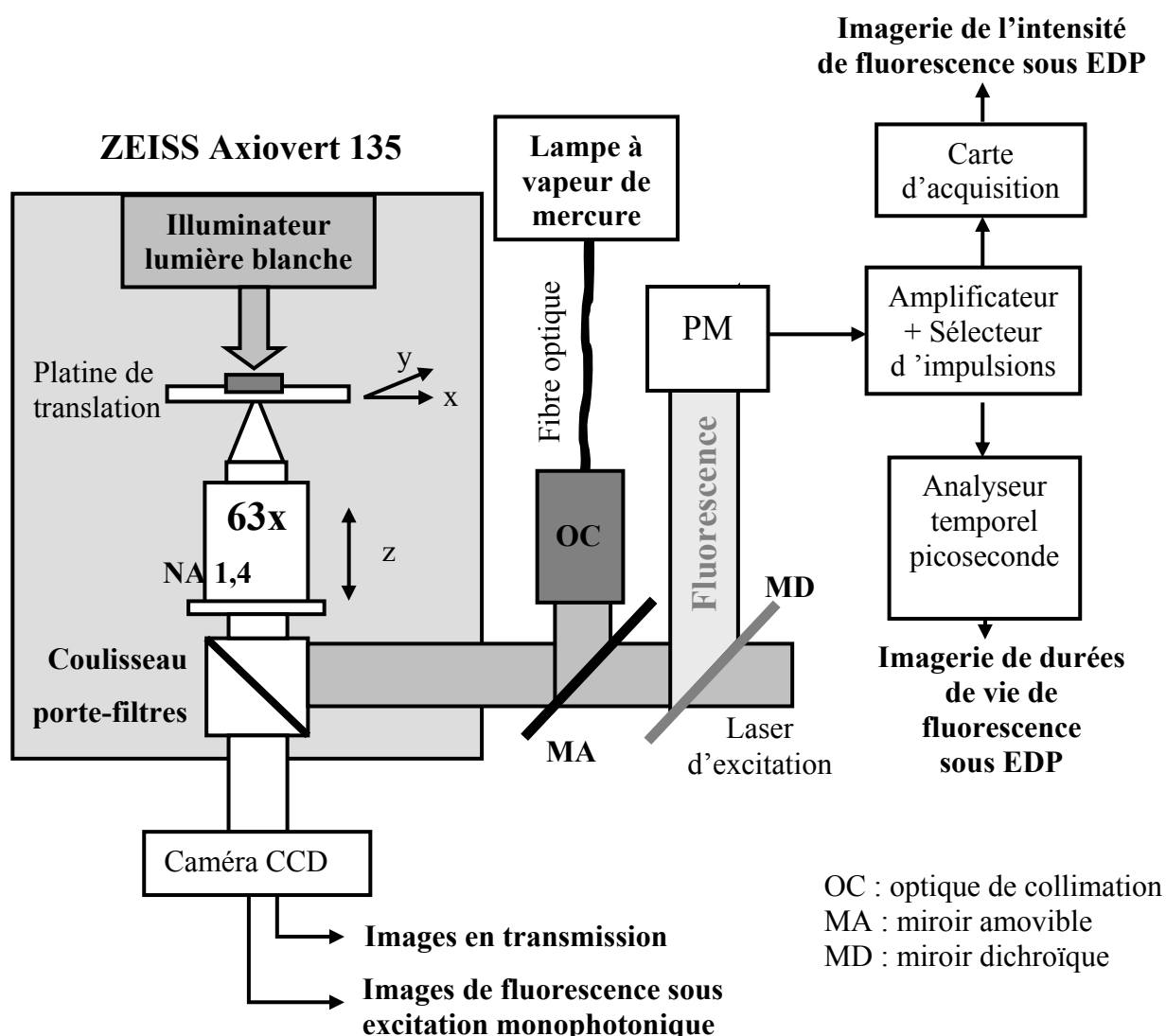


Figure IV.1.5: dispositif expérimental pour l'acquisition d'images en transmission (éclairage en lumière blanche), d'images d'intensité de fluorescence sous excitation monophotonique (excitation par une lampe à vapeur de mercure) ou biphotonique (excitation par le laser à saphir dopé au titane), et d'images de durées de vie de fluorescence.

Imagerie de la fluorescence sous excitation monophotonique.

L'acquisition d'images de la fluorescence de nos échantillons sous excitation monophotonique s'effectue en utilisant notre microscope dans une configuration d'épifluorescence. L'excitation de la fluorescence s'effectue par absorption monophotonique grâce à une lampe à vapeur de mercure (lampe AttoArc HBO 100 W, Carl Zeiss). Le rayonnement émis par la lampe est amené par un système fibre optique + optique de collimation fabriqué à notre demande par la société Micro-Mécanique. Le faisceau issu de ce système est envoyé dans l'objectif de microscope via le trajet normal d'épifluorescence au moyen d'un miroir amovible (utilisé uniquement pour cette configuration). Pour l'acquisition

des images de fluorescence, nous utilisons la position du coulisseau porte-filtres adaptée, c'est-à-dire l'emplacement contenant un jeu de filtres (filtre d'excitation, miroir dichroïque et filtre d'émission) appropriés au signal de fluorescence que l'on veut détecter. Les caractéristiques des filtres que nous avons utilisés pour la détection de la fluorescence de la KHD 161 sont représentées sur la figure IV.1.6. De la même manière que pour l'imagerie en transmission, la fluorescence est détectée par la caméra CCD reliée à la carte d'acquisition d'images DT 3120.

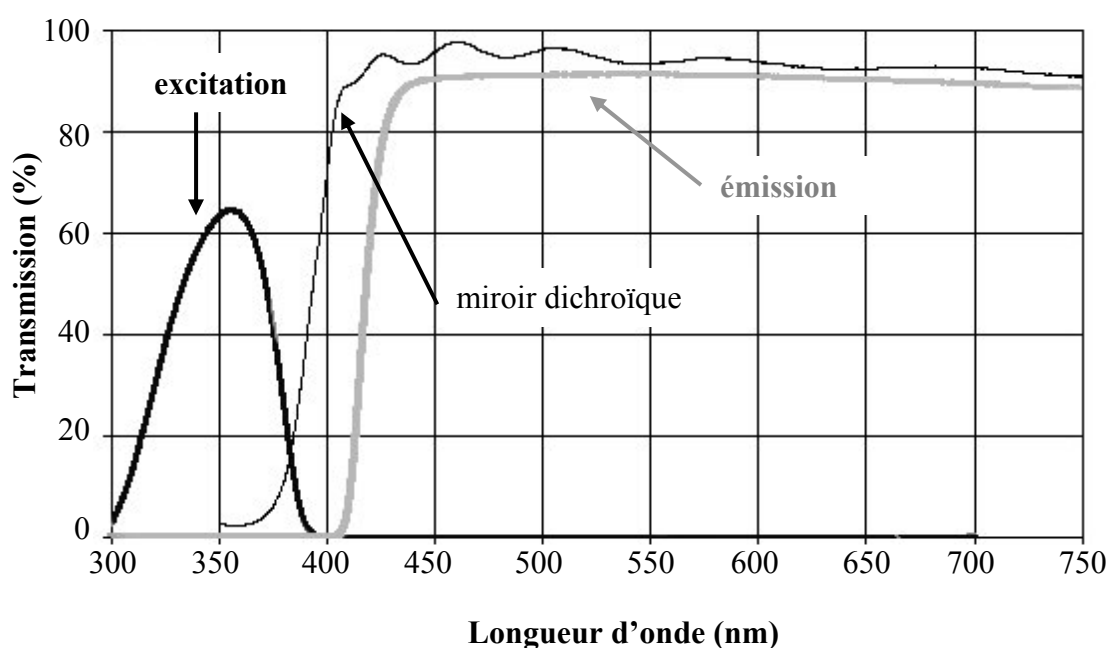


Figure IV.1.6: Caractéristiques des filtres utilisés pour la détection de la fluorescence de la KHD 161. Ces filtres permettent une excitation maximale autour de 350 nm et la détection de tout signal de fluorescence émis dont la longueur d'onde est supérieure à 425 nm environ.

Imagerie de l'intensité de fluorescence sous EDP.

Dans le cadre de cette thèse, les images de l'intensité de fluorescence sous EDP sont réalisées au moyen de la platine de translation pilotée par informatique dont est équipé notre microscope (voir montage expérimental pour la corrélation de fluorescence, chapitre III). Nous utilisons pour l'acquisition de ces images, la carte de comptage (PCI-6602, National Instrument, utilisée pour la corrélation de fluorescence) reliée à la sortie TTL de l'amplificateur et sélecteur d'impulsions de la chaîne de CPUCT. Le programme d'acquisition d'images d'intensité de fluorescence a été conçu de manière à contrôler le pas de translation de la platine, le nombre de points à sonder selon les deux directions x et y de la translation, et la durée d'acquisition par point (c'est-à-dire la durée de la porte temporelle utilisée par la

carte de comptage). Typiquement la durée d'acquisition par point sera de 10 ms. L'acquisition des images s'effectue alors point par point : à chaque déplacement de la platine, le nombre de photons détectés par le PM pendant la durée de l'acquisition par point est enregistré. On constitue ainsi une matrice qui contient pour chaque point de coordonnées (x,y), le nombre de photons détectés. L'image de l'intensité de fluorescence est ensuite construite à partir de cette matrice, en codant en fausses couleurs le nombre de photons de fluorescence détectés pour chaque point.

Imagerie des durées de vie de fluorescence sous EDP.

Comme dans le cas de l'imagerie de l'intensité de fluorescence sous EDP, l'imagerie de durées de vie de fluorescence est basée sur une acquisition point par point au moyen de la platine de translation. Les déclins de fluorescence sont enregistrés selon la procédure expliquée au paragraphe IV.1.1. Pour chaque déplacement de la platine, un déclin de fluorescence est mesuré pendant une durée d'acquisition définie initialement par l'utilisateur. Les déclins de fluorescence obtenus pour chaque point de coordonnées (x,y) sont mémorisés. Le programme d'analyse des données (fonctionnant sur le principe exposé au paragraphe IV.1.2) a été adapté à l'analyse d'un fichier contenant une série de plusieurs déclins. Suite au traitement des données, on obtient la distribution des durées de vie correspondant à chaque déclin. Pour chacune d'elle, une durée de vie moyenne τ_{Fm} est déterminée en calculant la somme des durées de vie pondérées par leur poids. L'image des durées de vie de fluorescence est finalement construite en fausses couleurs à partir de la matrice contenant la durée de vie moyenne calculée pour chaque point de coordonnées (x,y).

IV.2. Études *in vitro* de l'activité antitumorale de la camptothécine par mesures de fluorescence résolues en temps sous EDP.

Nous présenterons dans ce paragraphe une première application de notre technique de CPUCT sous EDP à l'étude de la réactivité d'une molécule antitumorale : la camptothécine. Plus précisément, la mesure de durée de vie de fluorescence a été appliquée à l'étude de l'interaction de la camptothécine avec la topoisomérase I, enzyme qui agit spécifiquement sur l'ADN (acide désoxyribonucléique) lors de sa réplication et qui semble intervenir dans l'action antitumorale de ce médicament. Nous noterons que la topoisomérase I est un composé difficile à isoler et donc disponible en quantité extrêmement faible. Cette étude

originale a donc été possible en raison des capacités de mesures en microvolumes offertes par notre microscope de fluorescence sous EDP.

Avant de présenter les résultats consécutifs à cette étude, nous exposerons tout d'abord les caractéristiques de la molécule de camptothécine (structure et propriétés spectrales) et nous définirons plus précisément le contexte de cette étude, qui s'inscrit dans un thème de recherche du laboratoire de Photophysique Moléculaire. Des mesures des durées de vie de la fluorescence de la camptothécine seule en solution, réalisées dans un but de validation de notre technique, seront également présentées.

IV.2.1. La molécule de camptothécine.

La molécule de camptothécine (CPT) (figure IV.2.1) est un alcaloïde isolé de l'arbre *Camptotheca acuminata* et cristallisé en 1966 par M.E. Wall *et al.* [Wall 1966]. Il a été démontré que cette molécule inhibait la synthèse de l'ADN et de l'ARN (acide ribonucléique) de cellules de mammifères ce qui permet d'envisager son utilisation comme molécule antitumorale. L'un de ses dérivés : la CPT-11 [Yang 1998, Aiyama 1992] (figure IV.2.1) est notamment utilisé cliniquement contre le cancer du colon.

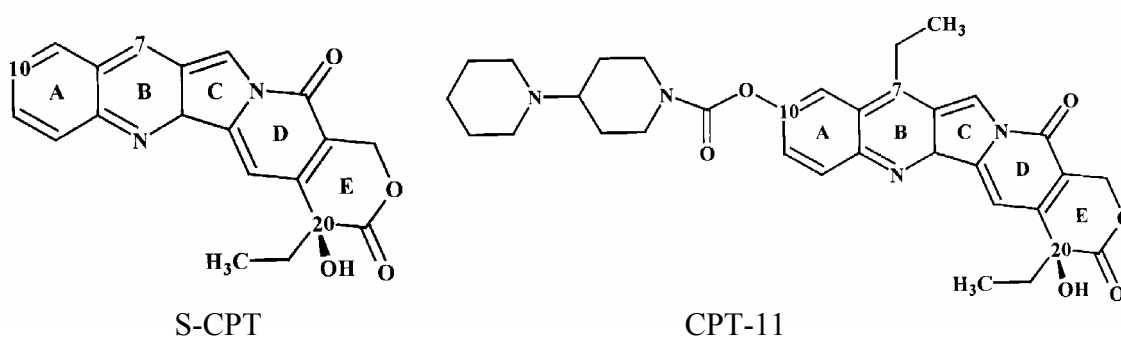


Figure IV.2.1 : structure de la molécule de S-CPT (ou énantiomère S de la camptothécine) et de son dérivé le CPT-11. Le terme énantiomère est défini dans le texte.

La molécule de CPT est composée d'un cycle quinoline (cycle A + cycle B, figure IV.2.1), relié (par un cycle C) à un cycle pyridone (D), et à un cycle lactone α -hydroxy (E) comportant un carbone chiral en C-20. Nous préciserons que la chiralité est la propriété que possède une molécule qui n'est pas superposable à son image dans son miroir. Ici, le caractère chiral est lié à la présence d'un carbone asymétrique. Une molécule possédant un tel carbone peut exister sous deux configurations non superposables appelées énantiomères S et R (figure IV.2.2).

L'énantiomère R a la propriété de dévier une lumière polarisée vers la droite, l'énantiomère S la déviant vers la gauche.

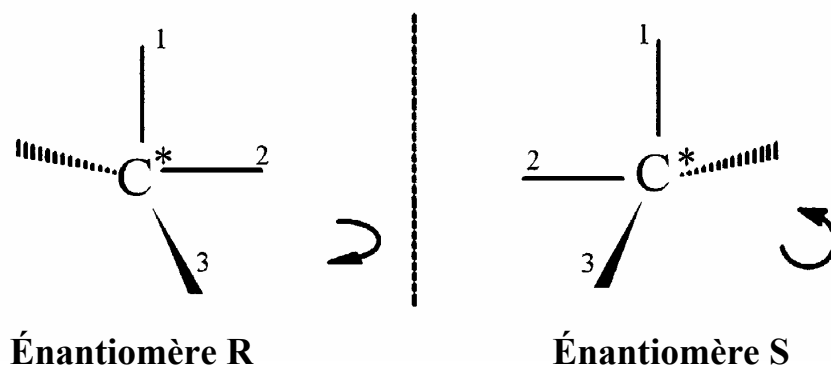


Figure IV.2.2 : représentation des deux énantiomères R et S autour d'un centre de chiralité.

Par rapport à ces notations, la molécule de CPT existe naturellement sous la forme S d'où la notation S-CPT sur la figure IV.2.1. Nous noterons que les deux énantiomères d'un composé chiral, en interaction avec d'autres entités chirales, présentent des propriétés physico-chimiques différentes. Par exemple, un seul énantiomère d'un médicament peut se révéler actif, ce qui est le cas pour la camptothécine (seul l'énantiomère S est actif).

La CPT peut par ailleurs exister sous deux formes : une forme lactone et une forme carboxylate (figure IV.2.3) [Chourpa 1998, Dey 1997]. Le passage d'une forme à l'autre s'effectue par une réaction d'hydrolyse ou inversement de lactonisation. La proportion de chacune des deux espèces dépend directement du pH du milieu : à pH acide ($\text{pH} < 4$), la CPT existe principalement sous sa forme lactone tandis que la forme carboxylate est majoritaire à pH basique ($\text{pH} > 8$). Au pH physiologique ($\text{pH} \sim 7$), les deux formes existent en équilibre.

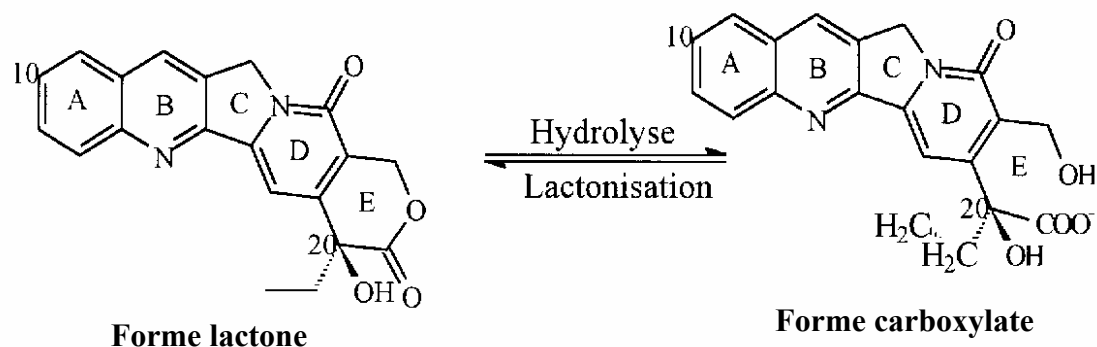


Figure IV.2.3 : structures de la CPT sous forme lactone ou carboxylate.

Ces deux formes sont caractérisées par des propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence légèrement différentes (figure IV.2.4). À pH 4, le spectre d'absorption de la CPT présente deux maxima, l'un à 350 nm, l'autre à 370 nm. À pH 8, le spectre d'absorption ne présente plus qu'un seul maximum autour de 375 nm. Les spectres d'émission de fluorescence obtenus à pH 4 et 8 pour une excitation à 370 nm, sont caractérisés par une seule bande de fluorescence centrée sur 440 nm et 450 nm respectivement.

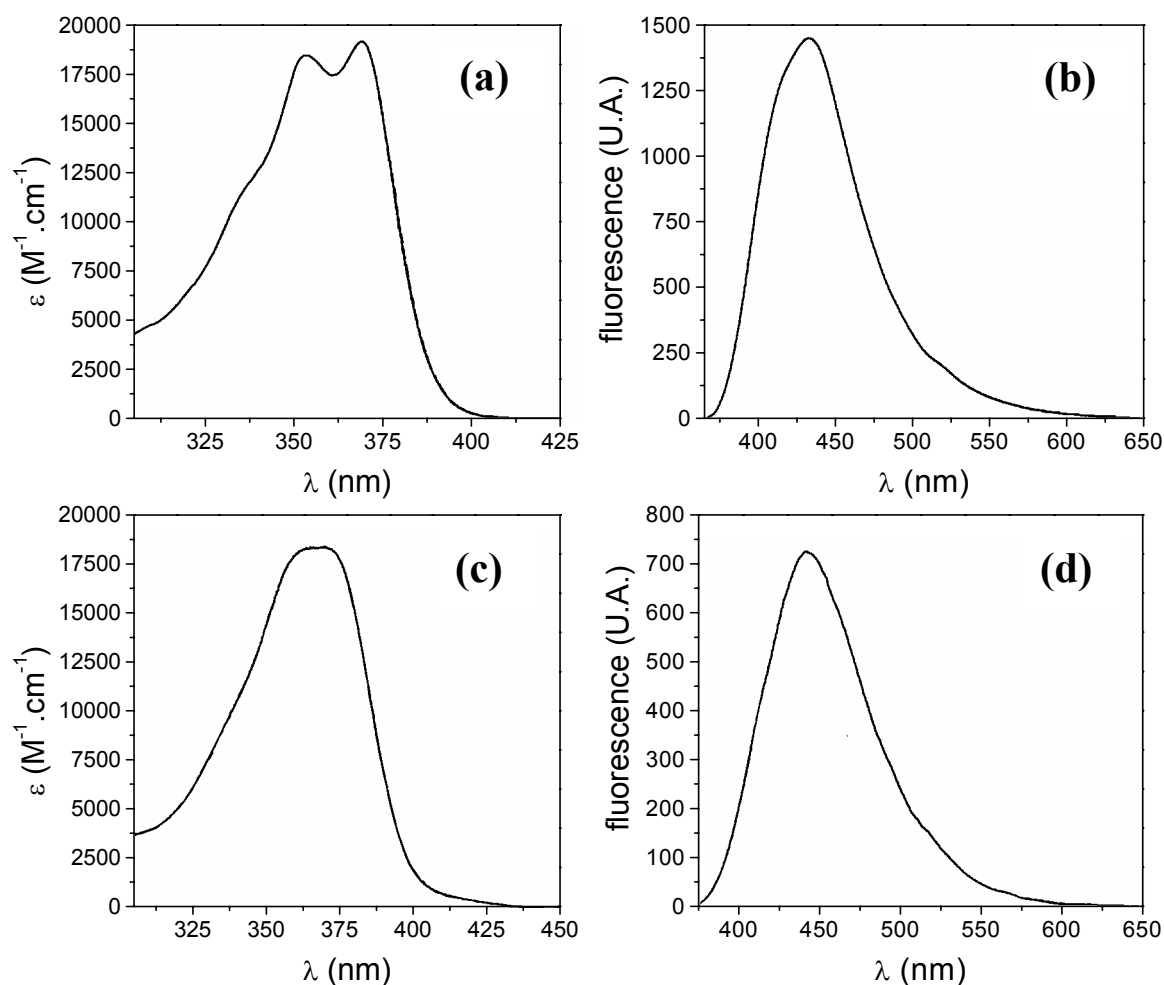


Figure IV.2.4 : spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la CPT en fonction du pH. (a) spectre d'absorption et (b) spectre d'émission de fluorescence mesuré à pH 4, concentration en CPT : 10 $\mu M/l$; (c) spectre d'absorption et (d) spectre d'émission de fluorescence mesuré à pH 8, concentration en CPT : 3,2 $\mu M/l$. Ces mesures ont été réalisées au Laboratoire de Photophysique Moléculaire.

IV.2.2. Contexte de notre étude sur l'activité antitumorale de la camptothécine.

Le cancer est une tumeur maligne formée par la prolifération incontrôlée et désordonnée de cellules d'un tissu lui conférant une structure anarchique. Plusieurs méthodes sont utilisées

pour lutter contre le cancer dont la (photo)chimiothérapie. Cette méthode fait appel à des substances chimiques qui permettent de bloquer la prolifération cellulaire en inhibant la réplication de l'ADN (acide désoxyribonucléique). La CPT et ses dérivés appartiennent à cette catégorie de substances.

Plus précisément, l'intérêt suscité par la CPT et ses dérivés pour la lutte contre le cancer provient du fait qu'ils appartiennent à une classe rare de molécules dont la propriété est d'inhiber l'activité de la topoisomérase I [Hsiang 1989, Nitiss 1988]. La topoisomérase I (topo I) est une enzyme qui agit sur l'ADN afin de relaxer ses torsions (rotation et enroulement de l'ADN double brin).

L'action de la topo I sur l'ADN est schématisée sur la figure IV.2.5 et s'effectue en quatre étapes [Lewin 1990]:

- 1^{ère} étape : la topo I se fixe sur l'ADN double brin par une liaison covalente phosphoester entre un groupement phosphate de l'ADN situé en 3' et un groupement hydroxyle de la tyrosine de la topo I (Tyr 723 dans le cas de la topo I humaine),
- 2^{ème} étape : cette liaison libère le groupement hydroxyle (5') et conduit à une coupure du brin d'ADN,
- 3^{ème} étape : le brin d'ADN intact se relaxe (rotation de 360° du brin intact),
- 4^{ème} étape : après ce tour complet du brin intact, la topo I referme le brin d'ADN coupé par une réaction de transestérification inverse.

Il a été démontré que l'activité antitumorale de la CPT nécessitait l'existence d'un complexe ternaire CPT - topoI - ADN [Jaxel 1989, Hertzberg 1989, Gupta 1995]. La présence de CPT intensifierait l'interaction covalente entre la topo I et l'ADN, stabiliserait le complexe topo I - ADN monobrin et empêcherait la refermeture du brin d'ADN. Finalement, l'accumulation de complexes covalents topo I - ADN entraînerait la mort cellulaire [Hsiang 1989, Slichenmyer 1993]. Cependant, l'existence d'une interaction entre la molécule de CPT et la topo I en l'absence d'ADN, analysée par des mesures d'intensité de fluorescence [Hertzberg 1989, Chourpa 1998], semblent exclues. De plus, aucune affinité importante de la CPT pour l'ADN n'a été détectée par l'étude *in vitro* des éventuelles interactions entre les deux entités [Gryczynski 1999].

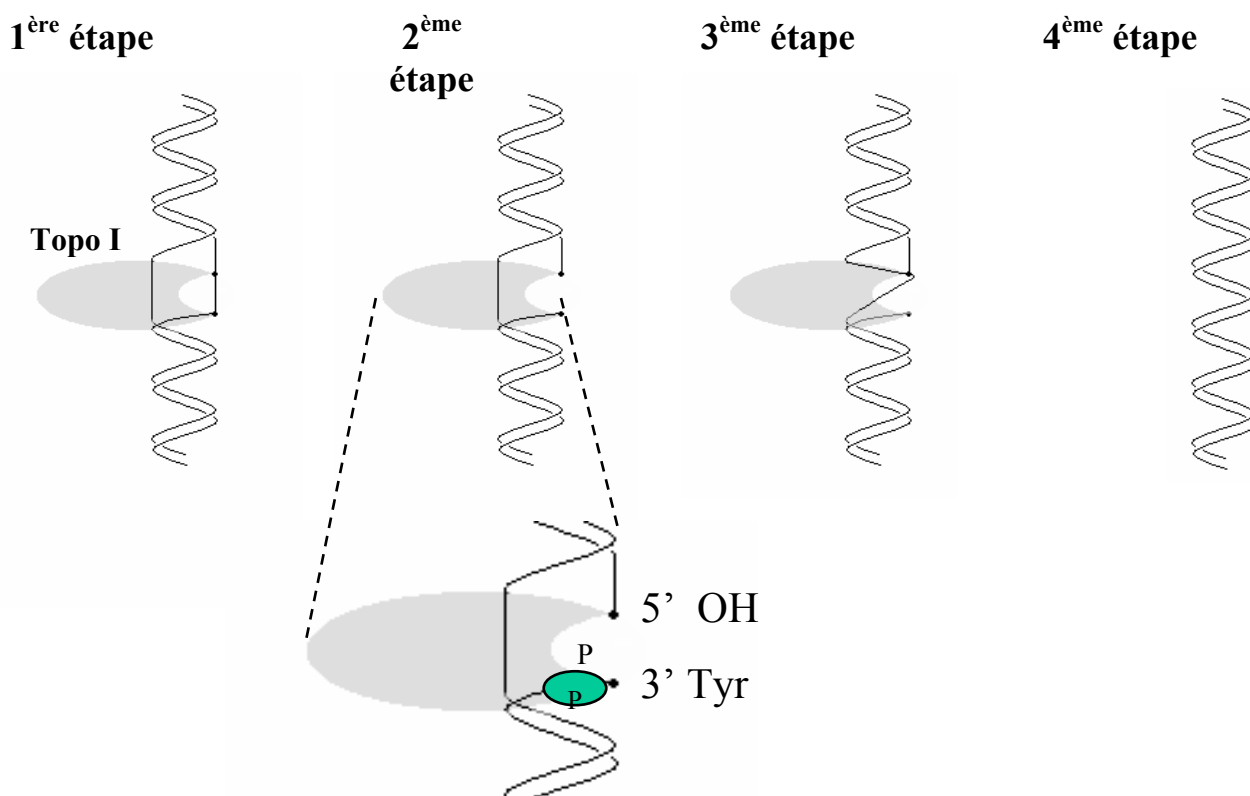


Figure IV.2.5 : action de la topoisomérase I sur l'ADN. 1^{ère} étape : fixation de l'enzyme sur un brin de l'ADN, 2^{ème} étape : coupure d'un brin, 3^{ème} étape : relaxation du brin intact, 4^{ème} étape : refermeture du brin d'ADN coupé.

À la suite de ces résultats, des études ont été réalisées afin de préciser le mode d'action de la CPT. Ainsi, il a été montré que l'activité antitumorale de ce médicament dépend fortement de la structure de la molécule. Tout d'abord, la configuration du centre de chiralité du carbone C-20 est très importante : l'énantiomère S de la CPT est actif, alors que l'énantiomère R (qui n'existe pas sous forme naturelle) est inactif [Jaxel 1989]. D'autre part, seule la forme lactone intervient dans l'activité antitumorale de la molécule. En plus d'être inactive, la forme carboxylate est quant à elle toxique [Gottlieb 1972, Moertel 1972].

Par ailleurs, si l'on appelle -1 la base située à l'extrémité 3' de l'ADN coupé, et +1 la base située à l'extrémité 5' (figure IV.2.5), la coupure de l'ADN par la topo I, s'effectue préférentiellement au niveau d'une thymine en position -1 et ce quel que soit la nature de la base en position +1. L'action antitumorale de la CPT est quant à elle sélective et observée uniquement lorsqu'une guanine est en position +1 [Pommier 1995, Jaxel 1991]. Ainsi, la CPT interagit probablement avec la guanine de l'extrémité 5' (position +1), un site qui ne devient accessible que lorsque le complexe covalent topo I – ADN est formé. De plus, l'activité antitumorale de la CPT est augmentée par sa photoactivation (excitation de la molécule).

Malgré ces divers résultats, le processus de formation du complexe ternaire topo I - ADN -CPT requis pour l'action antitumorale de la CPT demeure mal compris. Dans ce contexte, une étude complète, *in vitro*, de la réactivité de la molécule de CPT et en particulier de l'interaction CPT – guanine, a été entreprise au laboratoire de Photophysique Moléculaire, par des mesures stationnaires (mesures de spectres d'absorption et d'émission de fluorescence) et des mesures de fluorescence résolue en temps (sous excitation monophotonique) [Steenkeste 2001]. Cette étude a mis en évidence l'existence d'une interaction forte entre le cycle quinoline (A+B, figure IV2.1) de la CPT et la base guanine. Étant donnée l'absence d'interaction directe entre la CPT et l'ADN double brin, ce nouveau résultat semble confirmer que l'interaction entre la CPT et la base guanine n'est possible que si la base est libre, c'est-à-dire nécessite la coupure du brin d'ADN par la topo I au niveau de la base guanine. La présence de topo I semble donc nécessaire à l'activité antitumorale de la CPT.

Cependant, cette interaction CPT – guanine ne permet pas d'expliquer le rôle de la chiralité et de la structure lactone, qui fait intervenir le cycle lactone (E) dans l'activité antitumorale de la CPT. Notre technique d'analyse résolue en temps de la fluorescence sous excitation à deux photons (EDP) a donc été appliquée à l'étude de l'interaction éventuelle entre le cycle lactone de la CPT et la topo I. Cette première étude de la fluorescence résolue en temps de la CPT en présence de topo I a pu être réalisée en mettant à profit les avantages de notre instrumentation, notamment les capacités de mesures en microvolumes offertes par notre microscope de fluorescence sous EDP. Cet avantage est ici primordial, la topo I n'étant fournie qu'en quantité extrêmement faible (en terme de volume et de concentration) et pour un coût élevé en raison des procédés utilisés pour purifier cette enzyme.

D'autre part, l'analyse des durées de vie de fluorescence est une méthode mieux appropriée à la détection d'interactions que les techniques de mesures stationnaires de l'intensité de fluorescence.

IV.2.3. Mesures de la fluorescence résolue en temps par CPUCT sous EDP de la CPT.

Bien que l'EDP de la fluorescence d'un dérivé de la CPT (le topotecan) ait été démontrée [Gryczynski 1999], aucune donnée sur la CPT sous ce mode d'excitation n'a été rapportée à ce jour. Une première étape de notre étude consista donc à déterminer la longueur d'onde d'excitation correspondant à une émission de fluorescence optimale de cette molécule. En effet, les sections efficaces d'absorption à deux photons sont généralement faibles et rien

ne laissait présager que l'EDP de la CPT soit suffisamment efficace et par conséquent, que l'intensité de fluorescence de ce médicament soit suffisamment élevée pour être facilement détectable. Nous avons donc, dans un premier temps, vérifié les possibilités d'EDP de cette molécule. Pour cela, la CPT (fournie par Sigma) a été diluée dans un tampon phosphate (20 mM/l, pH 7). Le taux de comptage (nombre de photons de fluorescence détectés par seconde) a été mesuré en fonction de la longueur d'onde du laser. Pour des puissances moyennes incidentes égales, un taux de comptage maximal et constant a été mesuré sur la gamme de longueur d'onde de 730 nm à 760 nm. Nous avons choisi pour cette étude de la CPT d'utiliser la longueur d'onde d'excitation 750 nm.

Dans un second temps, nous avons déterminé les durées de vie de fluorescence des formes lactone et carboxylate de la CPT seule afin de valider notre technique de mesures de durées de vie par CPUCT sous EDP. Pour ces mesures, la CPT a été utilisée à une concentration d'environ 2 μ M/l dans le tampon phosphate (20 mMol/l, pH 7). À ce pH, il existe un équilibre entre les formes lactone et carboxylate de la molécule. Néanmoins, si l'on utilise la solution juste après sa préparation, la forme lactone est prédominante. L'étude de la forme carboxylate a été quant à elle effectuée en préparant initialement la solution de CPT à pH 8, et en rajustant le pH de la solution à 7 juste avant son utilisation.

Les déclins de fluorescence des formes lactone et carboxylate de la CPT obtenus par notre technique de CPUCT sous EDP ainsi que les résidus et les distributions de durées de vie de fluorescence correspondants sont représentés sur la figure IV.2.6. Ces acquisitions ont été effectuées sous un flux de photons incident de $1,6 \times 10^{30}$ photons/cm²/s (puissance moyenne de 20 mW) en utilisant une durée par canal de 2,44 ps pour la construction des déclins. La durée moyenne des acquisitions est d'environ 100 secondes (correspondant à environ 2 millions de photons détectés par déclin).

Pour les deux formes de la CPT, l'analyse des déclins de fluorescence de la CPT montre l'existence de deux durées de vie (tableau IV.2.1). La valeur de la durée de vie majoritaire est en bon accord avec de précédents résultats obtenus sous une excitation monophotonique [Dey 1997, Steenkeste 2001].

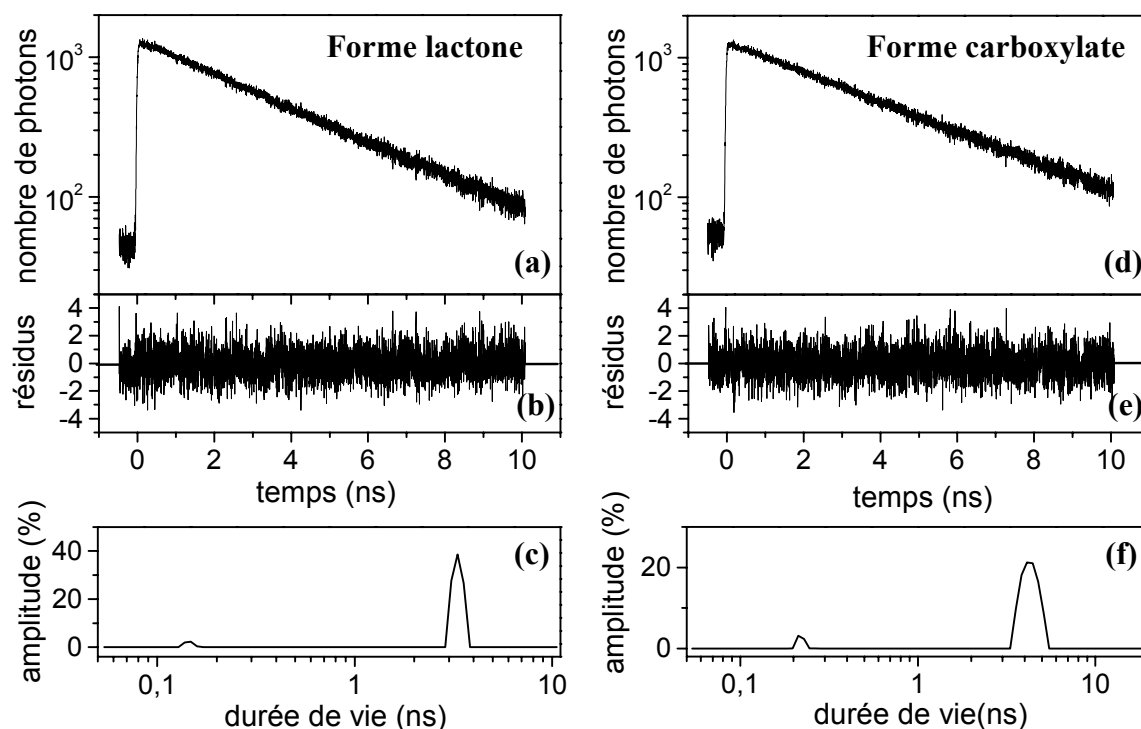


Figure IV.2.6 : déclins de fluorescence de la forme lactone (a) et de la forme carboxylate (d) de la CPT (concentration 2 $\mu\text{M/l}$, pH 7) obtenus par CPUCT sous EDP. (b) et (c) : résidus et distribution des durées de vie de fluorescence de la forme lactone obtenus suite à l'analyse des déclins; (e) et (f) : résidus et distribution des durées de vie de fluorescence de la forme carboxylate.

		τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	χ^2
Forme lactone	EDP	$3,3 \pm 0,2$	95	$0,14 \pm 0,02$	5	1,07
	EUP	$3,1 \pm 0,2$	86	$0,13 \pm 0,01$	14	1,13
Forme carboxylate	EDP	$4,3 \pm 0,2$	95	$0,22 \pm 0,02$	5	1,07
	EUP	$4,6 \pm 0,2$	88	$0,21 \pm 0,02$	12	1,02

Tableau IV.2.1 : durées de vie de fluorescence des formes lactone et carboxylate de la CPT. A_i ($i=1$ ou 2) correspond au poids de la composante de durée de vie τ_i . Les résultats obtenus par EDP sont comparés à des résultats précédemment obtenus sous excitation à un photon (EUP) des deux formes de la CPT à une concentration de 6 $\mu\text{M/l}$ [Steenkeste 2001]. Le paramètre χ^2 , obtenu par l'analyse des données atteste de la fiabilité des résultats.

Nous noterons que la composante d'amplitude minoritaire, de durée de vie d'une centaine de picosecondes a été attribuée à la présence de dimères (association de 2 molécules de CPT). En effet, il a été rapporté que la constante de dimérisation d'une telle molécule était d'environ $2 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}$ [Aiyama 1992]. Ainsi, pour des concentrations en CPT de 6 $\mu\text{Mol/l}$ et 2 $\mu\text{Mol/l}$,

le pourcentage de dimères formés est respectivement d'environ 12 % et 4 % ce qui correspond aux poids de la composante rapide des déclins de fluorescence que nous avons obtenus.

Les résultats de cette étude validant les capacités de notre technique de CPUCT sous EDP pour la détermination de durées de vie de fluorescence, nous avons entrepris les mesures de fluorescence résolue en temps de la CPT en présence de topo I.

IV.2.3. Mesures de la fluorescence résolue en temps par CPUCT sous EDP de la CPT en présence de topoisomérase I.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la topo I n'est fournie qu'en quantité extrêmement faible (en terme de volume et de concentration) et pour un coût élevé en raison des procédés utilisés pour purifier cette enzyme. La topo I dont nous disposions nous a en effet été fournie à une concentration d'environ 2 $\mu\text{M/l}$, dans une solution de volume total d'environ 70 μl à pH 7 contenant 50 % de glycérol.

Dans ces conditions, les acquisitions de déclins de la CPT en présence de topo I ont été effectuées sur des échantillons de 11 μl préparés en mélangeant 10 μl de la solution mère de topo I avec 1 μl de CPT. Afin de se placer dans des conditions favorables à l'observation d'une éventuelle interaction entre les deux composés, les solutions de CPT ont été préparées de manière à ce que le rapport concentration en topo I / concentration en CPT soit au moins supérieur à 2. Nous présentons ici les résultats obtenus pour une concentration en CPT d'environ 400 nM/l c'est-à-dire correspondant à un rapport concentration en topo I / concentration en CPT égal à 5.

Étant donnée la présence de glycérol dans la solution mère de topo I, nous avons tout d'abord réitérer les mesures des durées de vie des formes lactone et carboxylate de la CPT diluée dans des solutions contenant 50 % de glycérol et 50 % de tampon phosphate pH 7. Rappelons en effet que la durée de vie de fluorescence est un paramètre qui dépend de la viscosité du milieu. Les acquisitions ont été réalisées sous les mêmes conditions expérimentales (puissances incidentes, durée par canal) que celles décrites précédemment. La durée d'acquisition a néanmoins été augmentée en raison de la plus faible concentration en CPT utilisée (500 s au lieu de 100 s).

Dans ces conditions, nous avons observé une légère variation de la durée de vie de fluorescence des formes lactone et carboxylate de la CPT en présence de glycérol par rapport à celles obtenues dans le tampon phosphate seul (tableau IV.2.2). Nous noterons que pour la

concentration en CPT utilisée (400 nMol/l), la proportion de dimères formés devient négligeable ($< 1\%$). L'existence de pics secondaires dans les distributions de durées de vie de fluorescence (de poids total d'environ 20 %) que l'on observe sur la figure IV.2.7-c est donc ici uniquement due à la présence d'impuretés dans le glycérol.

Les mesures des déclin de fluorescence de la CPT en présence de topo I ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. Nous noterons tout d'abord que l'intensité de fluorescence de la CPT (forme lactone ou carboxylate) n'a pas été affectée par la présence de topo I. La figure IV.2.7, qui présente les résultats obtenus sur la forme lactone de la drogue, montre d'autre part, que les déclin de fluorescence de la CPT seule ou en présence de topo I sont parfaitement superposables. Aucune modification des durées de vie de fluorescence n'a été constatée suite à l'analyse de ces deux déclin (tableau IV.2.2).

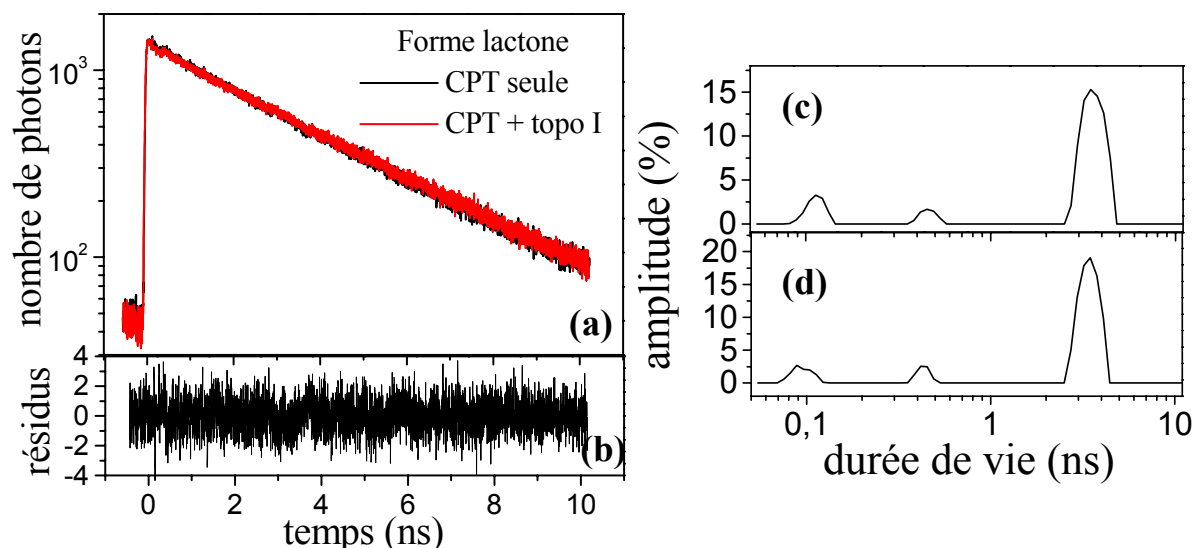


Figure IV.2.7 : (a) déclin de fluorescence de la forme lactone de la CPT en absence et en présence de topo I mesurés dans un tampon contenant 50 % de glycérol et 50 % de tampon phosphate pH7, (b) et (c) résidus et distribution des durées de vie de fluorescence obtenus suite à l'analyse du déclin de la forme lactone seule, (d) distribution des durées de vie de fluorescence de la forme lactone de la CPT en présence de topo I.

Nous préciserons que des résultats similaires ont été obtenus pour des rapports concentration en topo I / concentration en CPT variant de 2 à 10. Aucune modification n'a également été observée concernant les durées de vie de la forme carboxylate de la CPT en présence de topo I (tableau IV.2.2).

		τ_1 (ns)	A_1 (%)	χ^2
Forme lactone	Sans topo I	3.6 ± 0.2	82	1.18
	Avec topo I	3.5 ± 0.2	81	1.14
Forme carboxylate	Sans topo I	4.1 ± 0.2	78	1.19
	Avec topo I	4.1 ± 0.2	78	1.21

Tableau IV.2.2 : durées de vie de fluorescence des formes lactone et carboxylate de la CPT (concentration 400 $\mu\text{M/l}$) dans un tampon pH 7 contenant 50 % de glycérol en absence et en présence et de topo I et paramètre χ^2 attestant de la qualité de l'analyse des données.

À ce stade de l'étude, il nous restait à vérifier que cette interaction éventuelle de la CPT avec la topo I ne se manifestait pas par l'apparition de durées de vie longues (> 10 ns). Cependant, l'analyse de telles durées de vie n'était pas possible dans les conditions actuelles de notre montage en raison de la cadence élevée du laser à saphir dopé au titane. Rappelons en effet que la fréquence des impulsions de 76 MHz permet l'acquisition de déclins sur une durée maximale de 13 ns environ. Pour finaliser cette étude, nous avons donc intégré dans notre montage un sélecteur d'impulsions optiques (Pulse Picker modèle 9200, Coherent) permettant de réduire la fréquence des impulsions de 76 MHz à des fréquences comprises entre 4 MHz à 10 kHz. Les acquisitions de déclins de fluorescence de la CPT en présence de topo I ont alors été réitérées en utilisant une fréquence de 4 MHz permettant l'acquisition de déclins sur 250 ns. Notons que cette diminution de la fréquence des impulsions implique une diminution de la puissance moyenne incidente et impose donc une durée d'acquisition des déclins plus longue. Ainsi, la durée d'acquisition des déclins de fluorescence de la CPT (concentration 400 $\mu\text{M/l}$) fut d'environ 1000 s (15 min) sous une puissance moyenne incidente de 10 mW.

Le déclin de fluorescence de la forme lactone de la CPT en présence de topo I (pour un rapport concentration en topo I / concentration en CPT égal à 5) est présenté sur la figure IV.2.8.

Les résultats obtenus s'avèrent être exactement les mêmes que ceux obtenus précédemment indiquant que les déclins de fluorescence ne contiennent pas de composante de durée de vie longue. Un résultat similaire a été obtenu pour la forme carboxylate de la CPT en présence de topo I.

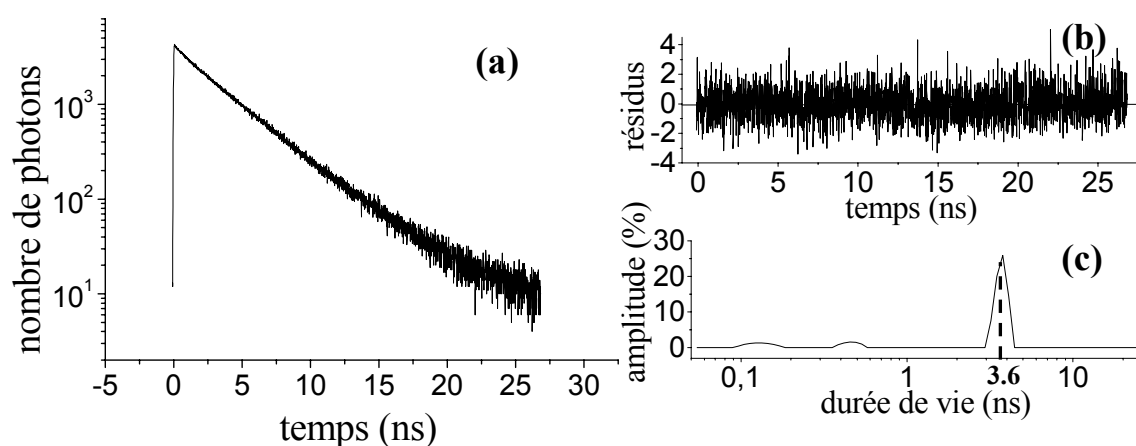


Figure IV.2.8 : (a) déclin de fluorescence de la forme lactone de la CPT en présence de topo I sous une fréquence des impulsions d'excitation de 4 MHz, (b) et (c) résidus et distribution des durées de vie de fluorescence obtenus suite à l'analyse du déclin.

En conclusion, l'analyse résolue en temps de la fluorescence de la camptothécine nous a permis, à travers la détermination des durées de vie de la fluorescence des formes lactone et carboxylate de la molécule, de valider notre technique de CPUCT sous EDP. L'absence de modification des durées de vie de fluorescence de la CPT en présence de topo I montre que la structure électronique du médicament n'est pas modifiée en présence de l'enzyme. Un tel résultat révèle l'absence d'interaction forte entre les deux composés. Néanmoins, l'existence d'une interaction impliquant des liaisons faibles de type Van der Waals ne peut être exclue [Steenkeste 2001].

IV.3. Études *in vitro* et *in vivo* de la fluorescence résolue en temps sous EDP d'une molécule inhibitrice du VIH : la KHD 161.

Nous présenterons dans ce paragraphe les premiers résultats d'imagerie *in vivo* de durées de vie de fluorescence, obtenus grâce à notre technique de CPUCT sous EDP. Cette étude a été réalisée sur la molécule KHD161, molécule inhibitrice du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) dans le but de vérifier d'une part, les possibilités de pénétration de ce médicament au sein de cellules et d'autre part, de tester notre programme d'imagerie résolue en temps de la fluorescence. L'exposé des résultats sera précédé d'une présentation du contexte de cette étude. Nous exposerons également des résultats de la fluorescence résolue en temps de la KHD 161 obtenus *in vitro*, étude préliminaire qui a permis de valider notre technique pour la détermination de durées de vie de quelques dizaines de picosecondes.

IV.3.1. La molécule KHD161.

La molécule de KHD 161 est une molécule de type 2-styrylquinoline (figure IV.3.1), classe de molécules dont la propriété est d'inhiber l'intégration de l'ADN viral du VIH dans l'ADN sain d'une cellule.

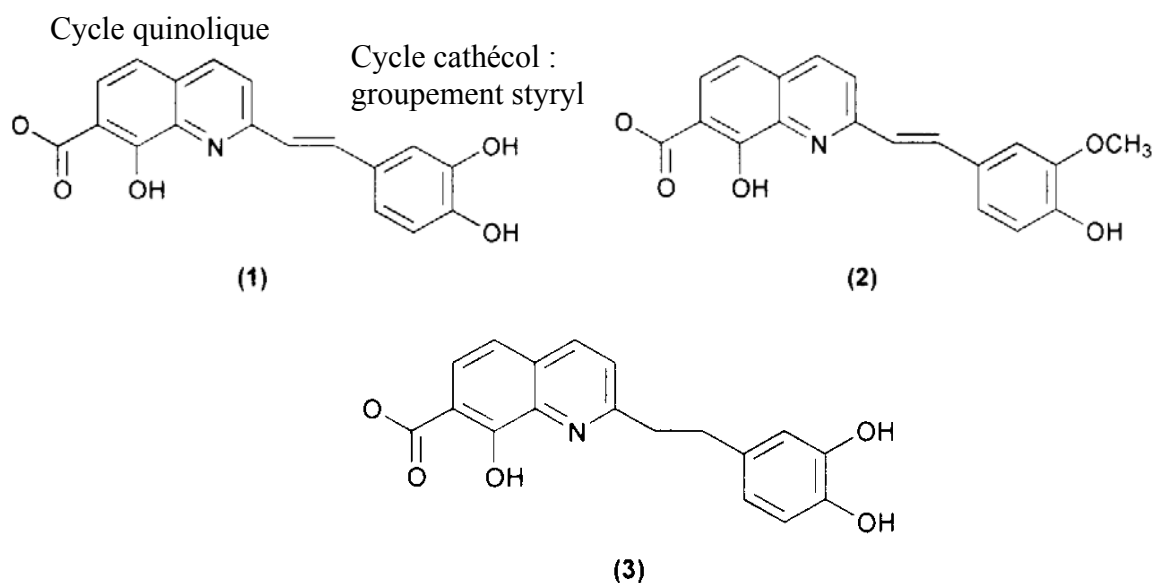


Figure IV.3.1 : structure de molécule de KHD161 (1) et de deux composés analogues (2 et 3). Ces trois molécules sont caractérisées par une structure de type 2-styrylquinoline.

La molécule de KHD 161 est composée d'un cycle quinolique et d'un cycle cathécol et existe sous deux conformations différentes appelées rotamères R1 et R2 nées de la possibilité d'une rotation autour de la liaison entre les deux cycles de la molécule (figure IV.3.2).

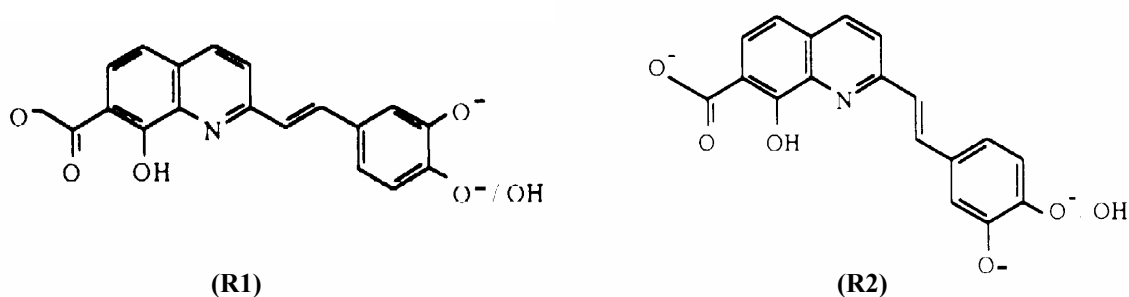


Figure IV.3.2: structure des deux rotamères R1 et R2 de la molécule de KHD 161.

L'existence de ces deux conformations de la KHD 161 a pu être révélée par l'étude des propriétés spectrales et des durées de vie de fluorescence de la molécule [Burdujan 2001]. Le spectre d'absorption de la KHD 161 présente deux maxima (figure IV.3.3-a) : l'un centré sur 330 nm, l'autre, de plus faible amplitude, situé autour de 260 nm.

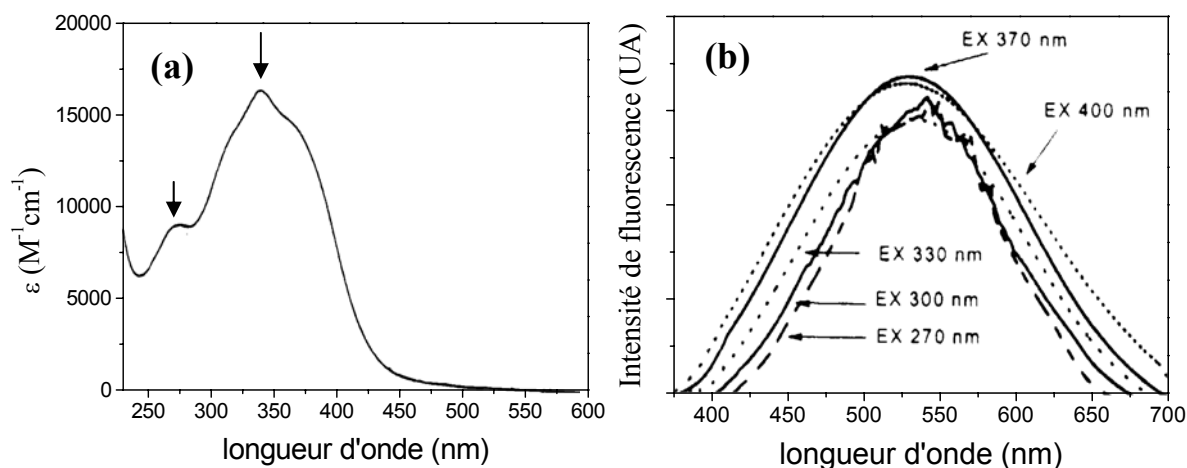


Figure IV.3.3: (a) spectre d'absorption et (b) spectres d'émission de fluorescence de la molécule de KHD 161 en fonction de la longueur d'onde d'excitation [Burdujan 2001].

Les similitudes entre le spectre d'absorption de cette molécule et celui d'autres styrylquinolines [Shim 1991, Galianzo 1983] permettent d'attribuer ces deux bandes d'absorption aux différentes parties de la molécule. Ainsi, la transition centrée à 260 nm correspond à l'absorption du cycle cathécol du fluorophore. La bande autour de 350 nm est quant à elle attribuée à l'absorption du cycle quinolique.

Le spectre d'émission de fluorescence de la KHD 161 est centré sur 540 nm quelque soit la longueur d'onde d'excitation utilisée (figure IV.3.3-b), indiquant que la fluorescence provient majoritairement de la partie quinolique de la molécule.

Des mesures de spectroscopie stationnaire, complétées par des mesures de fluorescence résolue en temps (sous excitation monophotonique) de la KHD 161, ont permis d'identifier les deux rotamères de la molécule et de déterminer leur durée de vie respectives. Le rotamère R1 est caractérisé par une durée de vie de fluorescence de 230 ps et un rendement quantique de 0,02. Le rotamère R2 est quant à lui caractérisé par une durée de vie de fluorescence très courte d'environ 30 ps et un rendement quantique dix fois plus faible que celui de R1 [Burdujan 2001].

IV.3.2. Contexte de notre étude de la fluorescence résolue en temps de la KHD 161.

Afin de situer le contexte de notre étude, nous commencerons par expliquer brièvement le mode d'action du VIH (figure IV.3.4).

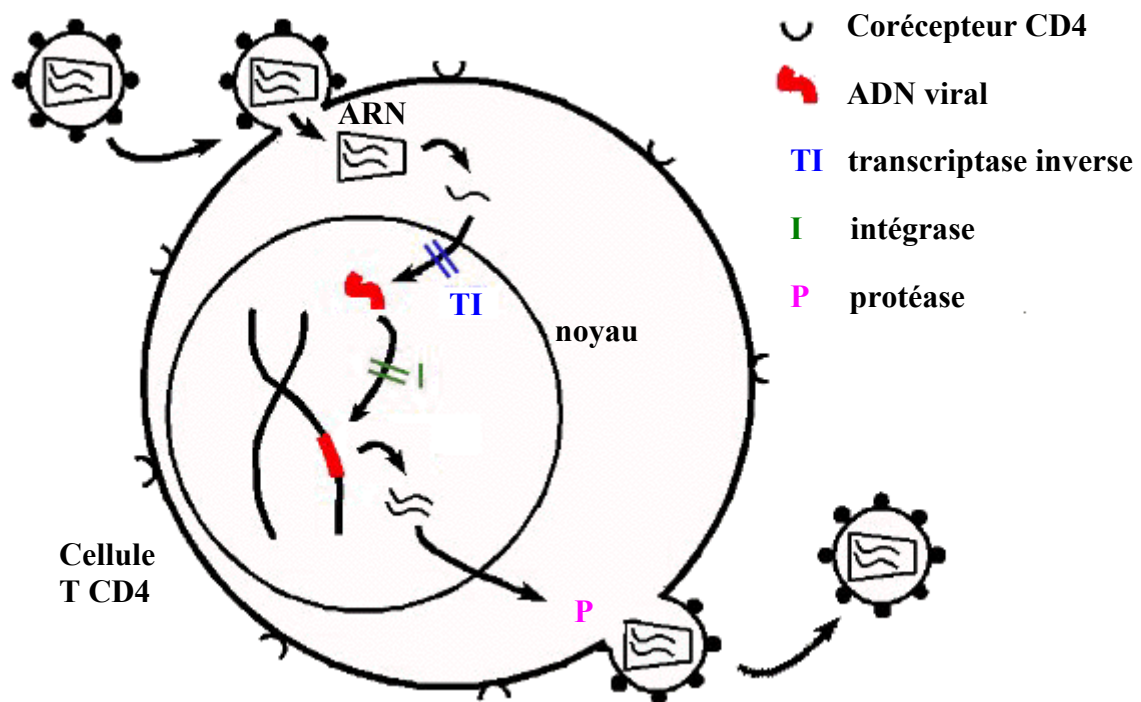


Figure IV.3.4 : illustration du mode d'action du VIH.

Le virus VIH envahit et détruit préférentiellement certaines cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T CD4 [Barlett 1998] : le virus pénètre dans les lymphocytes en se fixant sur la molécule CD4, nommée corécepteur, présente à sa surface. Cet ancrage assure la fusion de la membrane du VIH et de celle du lymphocyte : le virus libère alors son contenu dans le cytoplasme de la cellule, notamment diverses enzymes et deux brins d'ARN qui portent chacun la totalité du génome du VIH nécessaire à la fabrication de nouvelles particules virales. L'une des enzymes virales, la transcriptase inverse, recopie l'ARN du virus sous forme d'ADN double-brin qui ensuite intègre le noyau de la cellule. Une seconde enzyme, l'intégrase, participe alors à l'insertion de l'ADN viral dans l'un des chromosomes de la cellule infectée. Le noyau considère désormais le matériel génétique du virus comme le sien et son activité biologique va être détournée au profit du virus : la cellule va donc se mettre à synthétiser de nouveaux ARN viraux et des protéines virales qui permettront la formation de nouveaux virus. Pour que les nouveaux virus soient créés, une autre enzyme, la protéase, regroupe les protéines virales et l'ARN créés pour former de nouvelles particules virales. Ces particules bourgeonnent à la surface de la cellule infectées puis forment de nouveaux virus qui vont aller infecter d'autres cellules et ainsi de suite... Lorsqu'une cellule produit un trop grand nombre de particules virales, elle finit par être détruite. Une fois détruites, ces cellules ne semblent pas remplacées. Ainsi, l'infection par le virus VIH se traduit par une

concentration en particules virales qui s'accroît de plus en plus et détruit progressivement les lymphocytes T CD4. Lorsque la concentration en lymphocytes devient trop faible ($< 100 / \text{mm}^3$ de sang), le virus l'emporte sur le système immunitaire (c'est à ce stade de l'infection que l'on parle de SIDA : syndrome de l'immunodéficience actif).

Tous les médicaments utilisés contre le VIH bloquent la réplication virale à l'intérieur des cellules en inhibant soit la transcriptase inverse, soit la protéase du VIH. Cependant, aucun médicament inhibant l'intégrase n'est à ce jour utilisé cliniquement. Ainsi, de nombreuses études sont réalisées dans le domaine de la recherche de ce type de substances [Hazuda 2000]. Plusieurs inhibiteurs de l'action de l'intégrase ont été identifiés, mais ces derniers se sont révélés peu efficaces en milieu cellulaire. Néanmoins, certaines molécules de type 2-styrylquinoline ont récemment montré des propriétés d'inhibition de l'activité de l'intégrase *in vitro* mais aussi *in vivo* et ce sans effet toxique [Merkouar 1998, Zouhiri 2000, Ouali 2000].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la molécule de KHD 161. Nous présenterons dans un premier temps des études de la molécule effectuées *in vitro* afin de s'assurer de ses possibilités d'excitation à deux photons (EDP) et de vérifier les capacités de notre technique de comptage de photons uniques corrélés en temps (CPUCT) pour la détermination des durées de vie picosecondes de la molécule. Dans un second temps, nous présenterons une étude préliminaire effectuée *in vivo* afin de contrôler les possibilités de pénétration de ce médicament au sein d'une cellule. Nous terminerons ce paragraphe par la présentation de premières analyses et imageries des durées de vie de la fluorescence de la KHD 161 en milieu cellulaire, études réalisées dans le but de détecter d'éventuelles interactions du médicament avec les constituants de la cellule.

IV.3.3. Mesures *in vitro* des durées de vie de la KHD 161 par CPUCT sous EDP.

Aucune étude de la fluorescence de la KHD 161 sous excitation à deux photons n'ayant été réalisée à ce jour, une première étape de notre étude consista à déterminer la longueur d'onde d'excitation correspondant à une émission de fluorescence optimale de la molécule. Pour les mesures *in vitro*, la KHD 161 a été utilisée à une concentration d'environ $40 \mu\text{M/l}$ dans un tampon phosphate au pH physiologique (pH 7). Le taux de comptage (nombre de photons de fluorescence détectés par seconde) a été mesuré en fonction de la longueur d'onde du laser. Pour des puissances moyennes incidentes égales, un taux de comptage maximal a été mesuré autour de 750 nm, longueur que nous avons choisie d'utiliser

pour la suite de cette étude. Les possibilités d'EDP de la KHD 161 étant démontrées, nous avons procédé à l'acquisition de déclin de fluorescence de cette molécule.

L'acquisition des déclin a été effectuée sous un flux de photons incidents de $1,6 \times 10^{30}$ photons/cm²/s (puissance moyenne de 20 mW au foyer de l'objectif de microscope) en utilisant une durée par canal de 2,44 ps pour la construction des déclin. La durée moyenne des acquisitions est d'environ 100 secondes (correspondant à environ 2 millions de photons détectés par déclin). Un déclin de fluorescence caractéristique de la KHD 161 obtenu dans ces conditions ainsi que les résidus et les distributions de durées de vie de fluorescence correspondants sont représentés sur la figure IV.3.5.

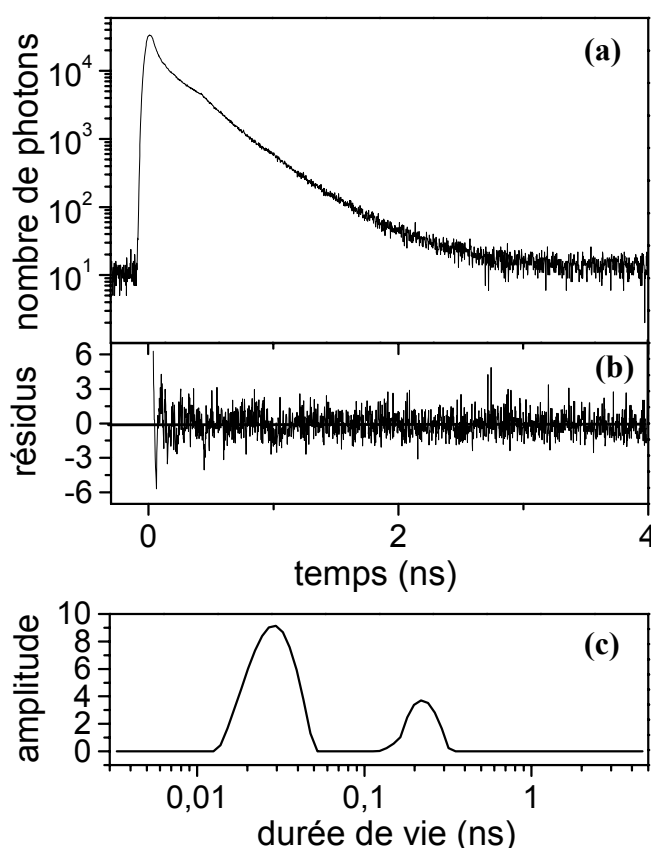


Figure IV.3.5 : (a) déclin de fluorescence de la molécule de KHD 161 (concentration 40 μ M/l, pH 7) obtenus par CPUCT sous EDP. (b) et (c) : résidus et distribution des durées de vie de fluorescence obtenus suite à l'analyse des déclin.

L'analyse du déclin de fluorescence de la molécule montre l'existence de deux composantes de durées de vie picosecondes, l'une de 25 ps ($\pm$ 10 ps) majoritaire à 80 %, l'autre de 260 ps ($\pm$ 30 ps) minoritaire (20 %), correspondant à une durée de vie moyenne τ_{FM} de 70 ps environ. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus sous une excitation monophotonique [Burdujan 2001]. Nous noterons qu'en ce qui concerne la durée de vie courte, nous travaillons ici à la limite de résolution de notre système. Par ces mesures, nous

montrons les performances de notre technique de CPUCT sous EDP et nous validons ses capacités en ce qui concerne la détermination de durées de vie de quelques dizaines de picosecondes.

IV.3.4. Imagerie *in vivo* de l'intensité et des durées de vie de fluorescence de la KHD 161.

Aucune étude n'a été rapportée à ce jour sur les possibilités de pénétration de la KHD 161 en milieu cellulaire. Ainsi, une seconde étape de notre étude de ce médicament a été réalisée dans le but de vérifier ce point mais aussi afin de tester les capacités de notre dispositif expérimental d'EDP pour l'imagerie de l'intensité et des durées de vie de fluorescence.

Ces études préliminaires ont été réalisées sur des cellules épithéliales humaines (cellules HeLa) fournies par le laboratoire de Physico-Chimie et Pharmacologie des Macromolécules Biologiques de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif). Ces cellules ont été choisies comme cellules tests pour des facilités de manipulation : ces cellules sont adhérentes et résistantes.

Des premiers tests d'imagerie d'intensité de fluorescence ont été effectués sur l'autofluorescence de cellules HeLa. Les figures IV.3.6 (a et b) présentent l'image en transmission d'un groupe de cellules et l'image correspondante de l'intensité d'autofluorescence obtenue sous EDP à 750 nm. Cette dernière image a été effectuée sous un flux de photons incident de 8×10^{29} photons/cm²/s (puissance moyenne incidente de 10 mW) et en utilisant des pas de translation de 2 μ m. L'image est composée de 625 points (25 points en x, 25 points en y). Nous précisons que la durée totale d'acquisition d'une telle image est de 2 min 30 s, ce qui est relativement long. En effet, si l'on considère que la durée d'acquisition par point est de 10 ms, la durée totale d'acquisition devrait être seulement d'environ 6 s. Néanmoins, nous sommes ici limités par la vitesse de déplacement de la platine de translation. La durée moyenne d'un déplacement et donc la durée moyenne de résidence sur un point ne peut être inférieure à 240 ms environ.

L'image IV.3.6-b montre l'existence d'une autofluorescence dans la quasi-totalité des cellules. Nous n'avons pas cherché ici à analyser plus précisément ce signal d'autofluorescence qui provient de fluorophores endogènes présents dans les cellules tels que des flavines, des porphyrines, etc. D'autre part, bien que notre méthode d'imagerie de l'intensité de fluorescence sous EDP basée sur une technique de comptage de photons ait

permis de détecter ce signal d'autofluorescence celui-ci ne fut pas suffisamment intense pour être visualisé sous excitation monophotonique (par la lampe à vapeur de mercure).

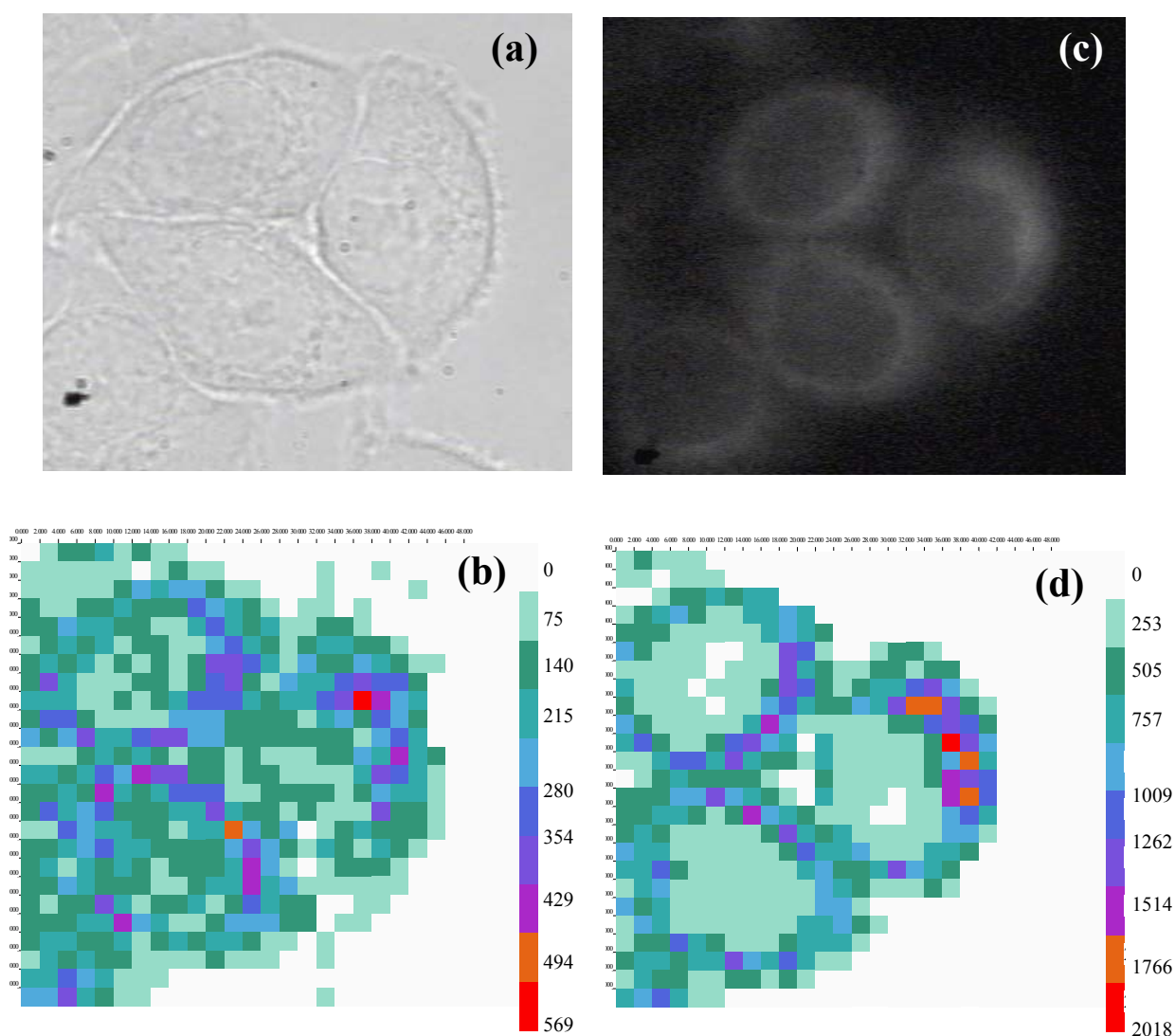


Figure IV.3.6 : (a) image en transmission, sous illumination en lumière blanche, d'un groupe de cellules HeLa, (b) image de l'intensité d'autofluorescence sous EDP de ce même groupe de cellule obtenue sous un flux de photons incident de 8×10^{29} photons/cm²/s (image de 25 points en x, 25 points en y, pas de translation de 2 μ m), (c) image de la fluorescence des cellules sous excitation monophotonique (lampe UV) après introduction de la KHD 161 (40 μ M/l), (d) image de l'intensité de fluorescence sous EDP de la KHD 161 introduite dans les cellules, obtenue sous un flux de photons incident de 8×10^{28} photons/cm²/s (image de 25 point en x, 25 points en y, pas de translation de 2 μ m).

Afin de s'affranchir de ce signal d'autofluorescence qui pourrait perturber les mesures en présence de la molécule KHD 161, l'intensité laser incidente a été atténuée. Nous utiliserons pour les études de la molécule de KHD 161 introduite dans les cellules un flux de photons incident de 8×10^{28} photons/cm²/s (puissance moyenne incidente de 1 mW). Dans ces conditions, le signal d'autofluorescence devient négligeable. L'introduction de la KHD 161

dans les cellules s'effectue simplement en immergeant les cellules dans une solution contenant la molécule (concentration en KHD 161 utilisée : 40 $\mu\text{M/l}$). L'acquisition d'images de la fluorescence sous excitation monophotonique au moyen de la lampe UV effectuée quelques secondes seulement après l'introduction de la KHD 161 montre une pénétration immédiate du médicament au sein de la cellule (figure IV.3.6-c). La fluorescence semble d'autre part homogène à l'intérieur du noyau et nettement plus intense à l'extérieur de celui-ci. L'acquisition d'une image de ce signal de fluorescence sous EDP (figure IV.3.6-d) conduit au même résultat.

Les images IV.3.6 c et d mettent donc en évidence les possibilités de pénétration de la KHD 161 dans les cellules HeLa, et ce jusqu'à l'intérieur de leur noyau. Cependant, à ce stade de l'étude, il est impossible d'interpréter avec certitude les différences d'intensités de fluorescence observées selon la localisation cellulaire (intérieur et extérieur du noyau). Celles-ci peuvent en effet être la conséquence d'une interaction spécifique de la KHD 161 avec la membrane du noyau ou simplement être dues à une différence de concentration en médicament, la membrane du noyau jouant un rôle de barrière à la pénétration du médicament.

Afin de vérifier ce point, nous avons procédé à l'acquisition d'images des durées de vie de fluorescence de la KHD 161 dans les cellules HeLa. Ces premiers tests d'imagerie résolue en temps de la fluorescence effectués par CPUCT sous EDP ont cependant été réalisés sur un nombre de points limités. En effet, l'acquisition d'un déclin de fluorescence par la technique de CPUCT est relativement longue. Les images de durées de vie de fluorescence que nous présentons sur la figure IV.3.7 résultent de l'acquisition de déclins de fluorescence selon deux lignes (l'une suivant la direction x, l'autre suivant la direction y). Les acquisitions des déclins ont été effectués avec le même pas de translation que celui utilisé pour l'imagerie d'intensité (2 μm), et une durée d'acquisition par point de 30 secondes. Ainsi, la durée totale de l'acquisition d'une série de 20 déclins sur une ligne est de 10 min.

Nous précisons que les acquisitions effectuées sur des points extérieurs à la cellule ne permet pas la détermination des durées de vie de fluorescence, l'intensité de fluorescence en ces points étant négligeable (d'où la représentation en rose sur les figures IV.3.7-d et e).

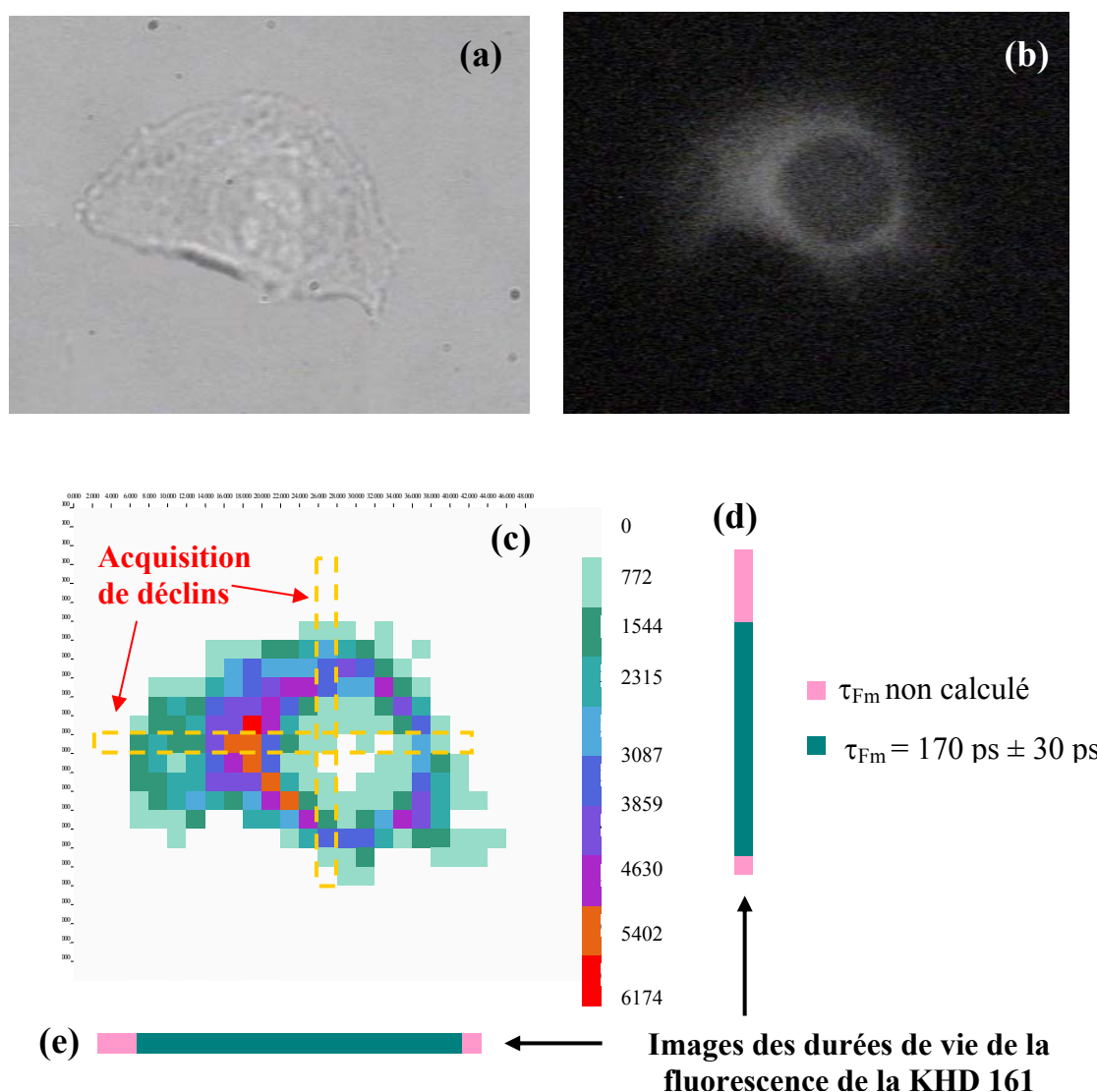


Figure IV.3.7 : (a) image en transmission d'une cellule HeLa, (b) image de la fluorescence des cellules sous excitation monophotonique (lampe UV) après introduction de la KHD 161 (40 $\mu\text{M/l}$), (c) image de l'intensité de fluorescence sous EDP de la KHD 161 introduite dans les cellules, obtenue sous un flux de photons incident de 8×10^{28} photons/cm²/s (image de 25 point en x, 25 points en y, pas de translation de 2 μm), (d) et (e) images des durées de vie de fluorescence moyennes de la KHD 161 résultant de l'acquisition de déclins de fluorescence selon les deux lignes matérialisées par des pointillés.

L'analyse des séries de déclins acquises sur une ligne fait apparaître une durée de vie moyenne τ_{Fm} de la KHD 161 au sein de la cellule d'environ 170 ps. Nous constatons que cette durée de vie moyenne est constante quelque que soit le point sondé dans la cellule. Les variations d'intensités de fluorescence observées résultent donc d'une concentration en KHD 161 hétérogène au sein de la cellule (et plus élevée à l'extérieur du noyau).

Par ailleurs, on constate une augmentation de la durée de vie moyenne de la fluorescence de la KHD 161 en milieu cellulaire ($\tau_{Fm} = 70$ ps pour la KHD 161 en solution). La compréhension de l'origine de cette augmentation nécessite alors une analyse plus fine des déclin de fluorescence intracellulaires. La figure IV.3.8 représente un déclin de fluorescence typique de la KHD 161 au sein d'une cellule HeLa ainsi que les résidus et la distribution des durées de vie obtenus suite à l'analyse des données.

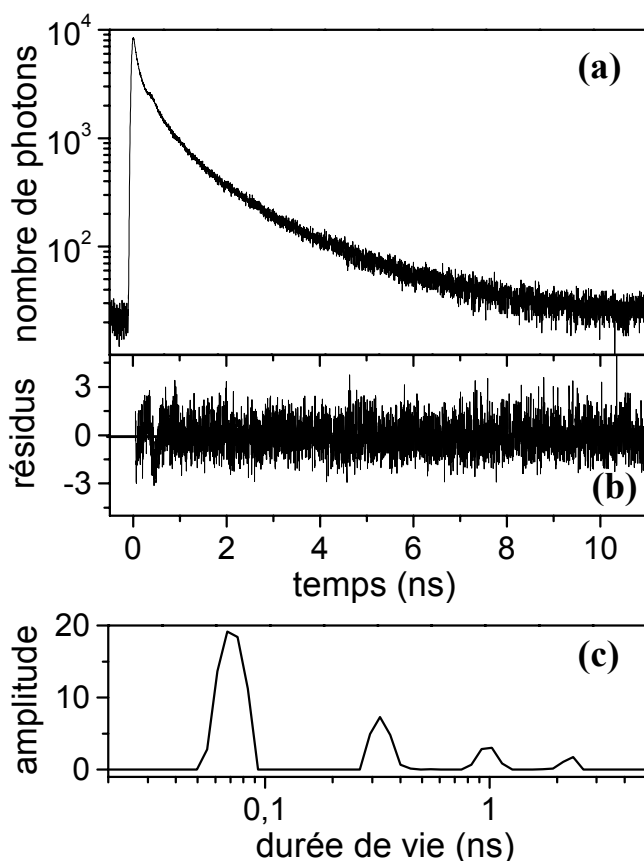


Figure IV.3.8: (a) déclin de fluorescence typique de la molécule de KHD 161 dans les cellules HeLa obtenus par CPUCT sous EDP. (b) et (c) : résidus et distribution des durées de vie de fluorescence obtenus suite à l'analyse des déclin ($\chi^2 = 1,08$).

Les valeurs des durées de vie ainsi que les poids de chacune des composantes sont rapportés dans le tableau IV.3.1. En comparant cette distribution des durées de vie de fluorescence caractéristique de la KHD 161 dans les cellules avec celle obtenue pour la molécule seule en solution (figure IV.3.5), on constate tout d'abord que les durées de vie de fluorescence des deux rotamères au sein des cellules sont légèrement plus longues qu'en solution. L'augmentation en milieu cellulaire de ces deux durées de vie peut s'expliquer par les changements de l'environnement de la molécule. Plus précisément, le confinement des molécules à l'intérieur de la cellule dans un environnement autre que le solvant utilisé pour

les études *in vitro* (moins de solvant, changements de la viscosité, etc) influe sur les processus de désexcitation non radiative et donc sur la durée de vie de fluorescence. L'existence de ces deux distributions de durées de vie prouve cependant la présence et donc la possibilité de pénétration dans les cellules des deux rotamères de la KHD 161.

Durée de vie	poids (%)
50 ps $\pm$ 10 ps	76 $\pm$ 5
320 ps $\pm$ 40 ps	18 $\pm$ 4
1.0 ns $\pm$ 0.2 ns	4 $\pm$ 2
2,2 ns $\pm$ 0.3 ns	2 $\pm$ 1

Tableau IV.3.1 : durées de vie de fluorescence de la KHD 161 dans les cellules HeLa, et poids de chacune des composantes.

D'autre part, on voit ici apparaître deux nouvelles composantes de durées de vie nanosecondes dont l'origine n'a pu être identifiée à ce stade de l'étude.

En conclusion, l'étude présentée ici a permis de démontrer les possibilités de pénétration des deux rotamères de la molécule de KHD 161 au sein de cellules de type HeLa. Nous avons validé les capacités de notre technique de CPUCT sous EDP pour l'imagerie de durées de vie de fluorescence en milieu biologique. Ces tests préliminaires étant concluants, une poursuite de cette étude est en cours avec des projets d'analyse de la fluorescence résolue en temps *in vitro* dans le but de détecter et d'analyser le processus d'interaction entre les deux rotamères de la molécule de KHD 161 et l'intégrase. Dans un second temps, l'imagerie des durées de vie de fluorescence de ce médicament au sein de cellule de type lymphocyte et contenant l'enzyme intégrase est envisagée afin d'analyser l'interaction entre les deux composés biologiques au sein des cellules impliquées lors d'une infection par le VIH. La compréhension du mode d'action de la KHD 161 au sein de ces cellules, notamment du rôle des deux rotamères constitue une étape essentielle en vue de l'utilisation clinique de ce médicament.

IV.4. Conclusions et perspectives.

Le système de CPUCT sous EDP que nous avons développé dans le cadre de notre projet de microscopie de fluorescence par excitation à deux photons a été utilisé avec succès

dans le cadre d'applications pharmacologiques. Les mesures effectuées sur des molécules en solution ont démontré les performances et la validité de notre technique en terme de détermination précise de durées de vie de fluorescence s'échelonnant de la dizaine de picosecondes à quelques nanosecondes. Les capacités de notre système de CPUCT sous EDP alliées à différents dispositifs d'imagerie de la fluorescence ont finalement été testées par une application en milieu cellulaire. Cette étude préliminaire, réalisée en milieu biologique vivant a démontré les possibilités de notre technique en terme d'imagerie de l'intensité et des durées de vie de fluorescence.

Bien que ces premiers tests soient concluants, deux limitations concernant les durées d'acquisition des images ont été mises en évidence. Tout d'abord, la construction des images d'intensité de fluorescence point par point, grâce à une platine de translation, permet des déplacements très fins des échantillons mais s'effectue au détriment de la rapidité d'acquisition. Rappelons en effet que la durée d'acquisition d'une image de 625 points est de 2 min 30 s. Pour résoudre ce problème, nous avons intégré dans notre montage deux miroirs montés sur galvanomètres (VM 500, General Scanning) permettant l'acquisition d'images par balayage des échantillons par le faisceau laser excitateur. Les programmes de pilotage informatique de ce système et de construction d'images d'intensité de fluorescence sont en cours de développement et permettront l'acquisition d'images en seulement quelques secondes. Dans un second temps, l'implantation dans notre montage d'un système d'excitation biphotonique multipoints utilisant à l'excitation, un disque de microlentilles rotatif [Bewersdorf 1998] (système décrit au paragraphe I.3) est envisagée. Ce mode d'excitation combiné à une détection de la fluorescence par une caméra CCD intensifiée permettra alors l'acquisition d'images d'intensité de fluorescence à la cadence vidéo (au moins 30 images par seconde).

La seconde limitation de notre technique actuelle provient de la cadence d'acquisition relativement lente des déclins de fluorescence dans le contexte de l'imagerie des durées de vie de fluorescence. En effet, notre technique de CPUCT et notre programme d'analyse des données permettent une détermination très précise des durées de vie de fluorescence mais cette précision est obtenue au détriment de la rapidité d'acquisition et d'analyse des déclins de fluorescence. L'objectif final dans le cadre du développement de notre dispositif expérimental est d'améliorer la durée d'acquisition des déclins en utilisant la technique d'échantillonnage temporel du déclin de fluorescence (chapitre I, paragraphe I.5.2.2). Dans ce but, le système d'imagerie biphotonique multipoints (disque de microlentilles +caméra CCD intensifiée) sera

combiné à une porte temporelle ultra-rapide (~ 100 ps) [Straub 1998], ce qui permettra simultanément l'analyse spatiale et résolue en temps de l'émission de fluorescence. Il est d'autre part prévu de procéder au développement de programmes d'analyse des données simplifiés pour une détermination plus rapide de durées de vie de fluorescence moyenne.

L'exploitation de ces avancées technologiques récentes permettra de développer un système d'imagerie rapide et sensible, caractérisé par une résolution spatiale sub-micronique et une résolution temporelle d'une dizaine de picosecondes. Cet équipement sera testé et optimisé pour la visualisation en temps réel (cadence vidéo) d'interactions moléculaires en milieu cellulaire, et permettra donc une approche innovante des mécanismes de signalisation cellulaire.

Conclusion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont donc consisté à la mise en place d'un système d'analyse et d'imagerie complet basé sur la technique récente de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons (EDP).

Le microscope biphotonique développé permet, grâce à un laser impulsif femtoseconde à saphir dopé au titane, de confiner l'excitation de la fluorescence dans le volume de focalisation, conduisant à une résolution spatiale submicrométrique. Associé à deux nouvelles techniques d'analyse de la dynamique d'émission de la fluorescence, le dispositif de microscopie permet l'étude à la fois spatiale et temporelle de la fluorescence.

La première technique d'analyse dynamique, la microscopie de corrélation de fluorescence (MCF) développée dans le cadre d'une excitation à deux photons a d'ores et déjà permis l'obtention de résultats intéressants. Cette technique, basée sur des mesures en micro-volume et sur une faible concentration moléculaire, a essentiellement été appliquée à l'étude du processus de diffusion translationnelle. Les mesures effectuées *in vitro* ont validé les performances et les capacités de notre technique pour la détermination précise de coefficients de diffusion moléculaire. En particulier, la MCF a permis, pour la première fois sous EDP, la détermination des coefficients de diffusion de sondes souvent utilisées en biologie : le FITC-dextran, et la GFP (Green Fluorescent Protein). La sensibilité extrême de notre dispositif en terme de capacités de détection d'une molécule unique a d'autre part été démontrée sur la molécule de fluorescéine.

Par ailleurs, la mise en place de cette instrumentation et la possibilité d'effectuer des mesures de diffusion à l'échelle moléculaire a favorisé une collaboration scientifique avec l'UBHM (Unité de recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, INRA, Massy). Cette collaboration est à l'origine d'une application novatrice et parfaitement concluante de la MCF sous EDP à l'étude des mécanismes de la diffusion moléculaire au sein de biofilms de bactéries. Par cette application, les capacités de la technique pour l'étude de processus dynamiques en milieux biologiques sont incontestablement démontrées.

Une évolution du système vers la technique de corrélation croisée est en perspective et permettra d'accéder à un domaine d'applications vaste et varié.

Notre technique d'imagerie des durées de vie fluorescence sous EDP, basée sur la méthode de comptage de photons uniques corrélés en temps (CPUCT), a quant à elle été appliquée dans le domaine de la pharmacologie, avec l'étude de la réactivité de deux molécules. De premières mesures, réalisées *in vitro* sur la molécule antitumorale de

camptothécine et sur la KHD 161 molécule inhibitrice du VIH, ont confirmé les performances et la validité de notre technique en terme de détermination précise de durées de vie de fluorescence s'échelonnant de la dizaine de picosecondes à quelques nanosecondes. Les capacités de notre système de CPUCT sous EDP ont finalement été appliquées en milieu cellulaire dans le contexte de l'étude de la réactivité de la molécule de KHD 161. Cette étude a permis de tester le premier système expérimental d'imagerie de l'intensité et des durées de vie de fluorescence que nous avons développé. Ce système, basé sur la construction d'images point par point, grâce à une platine de translation adaptée à notre microscope, permet l'acquisition d'images à haute résolution spatiale ($< 1 \mu\text{m}$) et temporelle ($\sim 20 \text{ ps}$). Néanmoins, ce mode d'acquisition des images souffre d'une limitation importante en terme de rapidité d'acquisition.

Pour résoudre ce problème, nous prévoyons de développer un système d'imagerie basé sur une technologie originale, qui à notre connaissance, n'a été exploitée dans aucun autre groupe que celui de Hell *et al.* [Straub 1998, Bewersdorf 1998]. Ce dispositif consiste en une excitation biphotonique multipoints grâce à un disque de microlentilles rotatifs associé à un système de détection par une caméra CCD intensifiée munie de portes temporelles ultra-rapides. La mise en place de ce système devrait permettre l'acquisition d'images d'intensité ou résolue en temps de la fluorescence à la cadence vidéo (au moins 30 images par seconde).

L'intégration au sein du même montage des deux systèmes de MCF et d'imagerie de fluorescence sous EDP permettra l'obtention d'un ensemble instrumental complet et totalement original destiné à l'étude de divers processus dynamiques et à la caractérisation fonctionnelle d'entités biologiques *in vitro* ou *in vivo*. Les domaines d'applications de notre microscope de fluorescence sous excitation à deux photons offrent donc des perspectives intéressantes pour les secteurs biologiques, médicaux ou pharmacologiques.

Références

- [Aiyama 1992] R. Aiyama, H. Nagai, S. Sawada, T. Yokokura, H. Itokawa, M. Nakanishu, "Determination of self-association of irinotecan hydrochloride (CPT-11) in aqueous solution", *Chem. Pharma. Bull.* **40**, (1992), 2810-2813.
- [Albota 1998a] M.A. Albota, C. Xu, and W.W. Webb, "Two-photon fluorescence excitation cross-section of biomolecular probes from 690 to 960 nm", *Applied Optics* **37**, n°31, (1998), 7352-7356.
- [Albota 1998b] M.A. Albota, D. Beljonne, J. Brédas, J.E. Ehrlich, J. Fu, A.A. Heikal, S.E. Hess, T. Kogej, M.D. Levin, S.R. Marder, D. McCord-Maughon, J.W. Perry, H. Röckel, M. Rumi, G. Subramaniam, W.W. Webb, X. Wu, C. Xu, "Design of organic molecules with large two-photon absorption cross section", *Science* **281**, (1998), 1653-1656.
- [Allison 2000] D.G. Allison, A.J. MacBain and P. Gilbert, "Biofilms: problems of control", in *SGM Symposium 59: Community Structure and Co-operation in biofilms*, Ed D.G. Allison, P. Gilbert, H. Lappin-Scott and M. Wilson, (Cambridge University Press, 2000), 309-325.
- [Anderson-Engels, 2000] S. Anderson-Engels, G. Canti, R. Cubeddu, C. Eker, C. Klinteberg, A. Pifferi, K. Svanberg, P. Taroni, G. Valentini and I. Wang, "Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection and the delineation of basal cell carcinomas of the skin", *Lasers in Surgery and Medicine* **26**, (2000), 76-82.
- [Aragon 1976] S.R. Aragon and R. Pecora, "Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics", *J. Chem. Phys.* **64**, (1976), 1791-1803.
- [Arrio-Dupont 1996] M. Arrio-Dupont, S. Cribler, G. Foucault, P. F. Devaux and A. d'Albis, "Diffusion of fluorescently labeled macromolecules in cultured muscle cells", *Biophysical Journal* **70**, (1996), 2327-2332.
- [Axelrod 1976] A. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elsen and W.W. Webb, "Mobility measurements by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics", *Biophysical Journal* **16**, (1976), 1055-1069.
- [Barlett 1998] J.H. Barlett and R.D. Moore, "L'amélioration des traitements contre le VIH", *Pour la science* n°251, (1998).
- [Bastiaens 1999] P.I.H. Bastiaens and A. Squire, "Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in cells", *Trends in Cell Biology* **9**, (1999), 48-52.
- [Bastiaens 2001] P.I.H. Bastiaens, P.J. Verveer, A. Squire and F. Wouters, "Fluorescence lifetime imaging microscopy of signal transduction protein reactions in cells", in *New trends in fluorescence spectroscopy*, édition Springer Series on Fluorescence, édité par B. Valeur et J.C. Brochon, (2001), chap 15, 297-302.

- [Berland 1995] K.M. Berland, P.T.C. So and E. Gratton, "Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intra-cellular environment", *Biophysical Journal* **68**, (1995), 694-701.
- [Bewersdorf 1998] J. Bewersdorf, R. Pick and S.W. Hell, "Multifocal multiphoton microscopy", *Optic Letters* **23**, (1998), 655-657.
- [Birmingham 1995] J.J. Birmingham, N.P. Hugues and R. Treolar, "Diffusion and binding measurements within oral biofilms using fluorescence photobleaching recovery method", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **29**, (1995), 325-343.
- [Bliton 1995] A.C. Bliton and J.D. Lechleiter, "Features of commercial UV-confocal microscope", in the *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London, 1995, Chap 27, 438-442.
- [Boyd 1992] R.W. Boyd, "The non linear optical susceptibility", in *Non Linear Optics*, (Academic Press, Inc, 1992), Chap 1, 1-32.
- [Bradbury 1984] J.F. Bradbury, "Genus II Xanthomonas" in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Editors NR Krieg, JG Holt, Williams & Wilkins, Baltimore, (1984), p.199-210.
- [Brakenhoff 1996] G.J. Brakenhoff, M. Müller and R.I. Ghauharali, "Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects", *Journal of Microscopy* **183**, (1996), 140-144.
- [Brand 1997] L. Brand, C. Eggeling, C. Zander, K.H. Drexhage and C.A.M. Seidel, "Single-molecule identification of Coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection: comparison of one- and two-photon excitation in solution", *J. Phys. Chem.* **101**, (1997), 4313-4323.
- [Briandet 1999] R. Briandet, "Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création et l'entretien de biofilms - Aspects physico-chimiques" Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (1999).
- [Brock 1998] R. Brock, M.A. Hink and T. Jovin, "Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence", *Biophysical Journal* **75**, (1998), 2547-2557.
- [Brüssow 2001] H. Brüßow, "Phages of dairy bacteria", *Annual Review of Microbiology* **55**, (2001), 283-303.
- [Bryers 1993] J.D. Bryers, "Bacterial biofilms", *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, (1993), 197-204.
- [Bryers 1994] J.D. Bryers, "Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion", *Colloids and Surface B: Biointerface* **2**, (1994), 9-23.

- [Bryers 1998] J.D. Bryers and F. Drummond, "Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching", *Biotechnology and Bioengineering* **60**, (1998), 462-473.
- [Buist 1997] A.H. Buist, M. Müller, E.J. Gijsberg, G.J. Brakenhoff, T.S. Sosnowsky, T.B. Norris and J. Squier, "Double-pulse fluorescence lifetime measurements", *Journal of Microscopy* **186**, (1997), 212-220.
- [Burdujan 2001] R. Burdujan, J. d'Angelo, D. Desmaële, F. Zouhiri, P. Tauc, J.C. Brochon, C. Auclair, J.F. Mouscadet, P. Pernot, F. Tfibel, M. Enescu and M.P. Fontaine-Aupart, "Spectroscopy and photophysics of styrilquinoline-type HIV-1 integrase inhibitors and its oxidized forms studied by steady-state and time resolved absorption fluorescence", *Physical Chemistry Chemical Physics* **3**, (2001), 3797-3804.
- [Busscher 1995] H.J. Busscher, R. Bos and H.C. van der Mei, "Initail microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion", *FEMS Microbiology Letters* **128**, (1995), 229-234.
- [Carpentier 1994] B. Carpentier and O. Cerf, "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry", *Journal of Applied Bacteriology* **75**, (1993), 499-511.
- [Centonze 1998] V.E. Centonze and J.G. White, "Multiphoton excitation provides optical sections from deeper scattering specimens than confocal imaging", *Biophysical Journal* **75**, (1998), 2015-2024.
- [Chattoraj 1996] M. Chattoraj, B. A. King, G. U. Bublitz and S.G. Boxer, "Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, (1996), 8362-8367.
- [Chen 1999] Y. Chen, J.D. Müller, K.M. Berland and E. Gratton, "Fluorescence fluctuation spectroscopy", *Methods* **19**, (1999), 234-252.
- [Chen 2001] Y. Chen, J.D. Müller, J.S. Eid and E. Gratton, "Two-photon fluorescence fluctuation spectroscopy", in *New trends in fluorescence spectroscopy*, édition Springer Series on Fluorescence, édité par B. Valeur et J.C. Brochon, (2001), chap 4, 277-295.
- [Chourpa 1998] I. Chourpa, J.M. Millot, G.D. Socalingum, J.F. Riou, M. Manfait, "Kinetics of lactone hydrolysis in antitumor drugs camptothecin series as studied by fluorescence spectroscopy ", *Biochemica et Biophysica Acta* **1379**, (1998), 353-366.
- [Cubeddu 1993] R. Cubeddu, P. Taroni and G. Valenti, "Time-gated imaging system for tumour diagnosis", *Optical Engineering* **32**, (1993), 320-325.
- [Cubeddu 1995] R. Cubeddu, A. Pifferi, P. Taroni, G. Valenti, G. Canti, "Tumor detection in mice by measurement of fluorescence decay time matrices", *Optics Letters* **26**, (1995), 2553-2555.

- [Costerton 1995] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber and H.M. Lappin-Scott, "Microbial biofilms", *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, (1995), 711-745.
- [Davies 1998] D. G.Davies, M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg, "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm", *Science* **280**, (1998), 295-298.
- [Denk 1990] W. Denk, J.H.Strickler, W.W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", *Science* **248**, (1990), 73-76.
- [Denk 1995] W. Denk, D.W. Piston and W.W. Webb, "Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy" in the *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London, 1995, Chap 28, 445-458.
- [Dey 1997] J. Dey, I.M. Warner, "Spectroscopic and photophysical studies of the anticancer drug: Camptothecin ", *Journal of luminescence* **71**, (1997), 105-114.
- [Diels 1985] J.C. M. Diels, J.J. Fontaine, I.C. McMichael and F. Simoni, "Control and measurement of ultrashort pulse shapes (in amplitude and phase) with femtosecond accuracy", *Appl. Opt.* **24**, n°9, (1985), 1270-1282.
- [Dix 1990] J.A. Dix and A.S. Verkman, "Pyrene excimer mapping in cultured fibroblasts by ratio imaging and time-resolved microscopy", *Biochemistry Journal* **29**, (1990), 1949-1953.
- [Dong 1995] C.Y. Dong, P.T.C. So, T. French, and E. Gratton, "Fluorescence lifetime imaging by asynchronous pump-probe microscopy", *Biophysical Journal* **69**, (1995), 2234-2242.
- [Dowling 1998] K. Dowling, M.J. Dayel, M.J. Lever, P.M.W. French, J.D. Hares and A.K.L. Dymoke-Bradshaw, "Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications", *Optics Letters* **23**, (1998), 810-812.
- [Draajer 1995] A. Draajer, R. Sanders and H.C. Gerritsen, "Fluorescence lifetime imaging, a nex tool in confocal microscopy" in the *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London, 1995, Chap 31, 491-505.
- [Eaton 1990] D.F. Eaton, "Recommended methods for fluorescence decay analysis", *Pure & Applied Chemistry* **62**, (1990), 1631-1648.
- [Elson 1974] E.L. Elson and D. Magde, "Fluorescence correlation spectroscopy: conceptual basis and theory", *Biopolymers* **13**, (1974), 1-27.
- [Ehrenberg 1974] M. Ehrenberg and R.Rigler, "Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations", *Chem. Phys.* **4**, (1974), 390-401.

- [Fischer 1995] A. Fischer, C. Cremer and E.H.K. Stelzer, "Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a titanium-sapphire laser", *Appl. Opt.* **34**, n° 12, (1995), 1989-2003.
- [Fischer 1997] W.G. Fischer, E.A. Wachter, M. Armas, and C. Seaton, "Titanium:sapphire laser as an excitation source in two-photon spectroscopy", *Appl. Spectrosc.* **51**, n°2, (1997), 218-226.
- [Fontaine-Aupart 1996] M.P. Fontaine-Aupart, H. Laguitton-Pasquier, R. Pansu, L. Brian, E. Renault, M.C. Marden, C. Rivalle and E. Bisagni, "Proton and charge transfer in the intercalating antitumour drug pazelliptine", *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**, (1996), 1767-1774.
- [Fork 1984] R.L. Fork, O.E. Martinez, J.P. Gordon, "Negative dispersion using pair of prisms", *Opt. Lett.* **9**, (1984), 150-152.
- [Frank 1990] J.F. Frank and R.A. Koffi, "Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat", *Journal of Food Protection* **53**, (1990), 550-554.
- [French 1996] T. French, "The development of fluorescence lifetime imaging and an application in immunology", *Thesis*, (Laboratory for Fluorescence dynamics-Department of Physics- University of Illinois at Urbana-Champaign-1996).
- [French 1997] T. French, P.T.C. So, D.J. Weaver, T. Coehlo-Sampaio, and E. Gratton, "Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy of macrophage-mediated antigen processing", *Journal of Microscopy* **185**, (1997), 339-353.
- [French 1998] T. French, P.T.C. So, C.Y. Dong, K.M. Berland and E. Gratton, "Fluorescence lifetime imaging techniques for microscopy", in *Methods in Cell Biology* **56**, (Academic Press, 1998), chap 14, 277-287.
- [Friedrich 1982] D.M. Friedrich, "Two-Photon Molecular Spectroscopy", *Journal of Chemical Education* **59**, n° 6, (1982), 472-481.
- [Galiazzo 1983] G. Galiazzo, G. Gennari, P. Bortolus, *Journal of Photochemistry* **23**, (1983), 149.
- [Gerritsen 1997] H.C. Gerritsen, R. Sanders, A. Draajer, C. Ince and Y.K. Levine, "Fluorescence lifetime imaging of oxygen in living cells", *Journal of fluorescence* **7**, (1997), 11-15.
- [Gerritsen 1999] H.C. Gerritsen, J.M. Vroom and C.J. de Grauw, "Combining two-photon excitation with fluorescence lifetime imaging", *IEEE Engineering in medicine and Biology*, (Sept-Oct 1999), 31-36.
- [Glanzmann 1999] T. Glanzmann, J.P. Ballini, H. Van der Bergh and G. Wagnieres, "Time-resolved spectrofluorometer for clinical tissue characterization

- during endoscopy”, *Review of Scientific Instruments* **70**, (1999), 4067-4077.
- [Göpper-Mayer 1931] M. Göpper-Mayer, “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen”, *Ann. Phys.* **9**, (1931), 273-295.
- [Gottlieb 1972] J.A. Gottlieb, J.K. Luce, “ Treatment of malignant melanoma with camptothecin ”, *Cancer Chemother. Rep.* **56**, (1972), 103-105.
- [Gryczynski 1999] I. Gryczynski, Z. Gryczynski, J.R. Lakowicz, D. Yang and T.G. Burke, “Fluorescence spectral properties of the anticancer drug topotecan by steady-state and frequency domain fluorometry with one-photon and multi-photon excitation”, *Photochemistry and Photobiology* **69**, (1999), 421-428.
- [Guilbert 1995] P. Guilbert and M.R.W. Brown, “Mechanisms of the protection of bacterial biofilms from antimicrobial agents”, in *Microbial Biofilms*, Edited by H.M. Lappin-Scott and JW. Costerton, (Cambridge University Press, 1995), 118-130.
- [Gupta 1995] M. Gupta, A. Fujimori, Y. Pommier, “Eukaryotic DNA topoisomerase I”, *Biochimica et Biophysica Acta* **1262**, (1995), 1-14.
- [Hamilton 1995] W.A. Hamilton, “Biofilms and microbially influenced corrosion” in :*Microbial biofilms* Ed. HM Lappin-Scott and W Costerton, (1995), Cambridge university press, Cambridge, UK, p.171-182.
- [Hänninen 1994] P.E. Hänninen and S.W. Hell, “ Femtosecond pulse broadening in the focal region of a two-photon fluorescence microscope”, *Bioimaging* **2**, (1994), 117-121.
- [Haupts 1998] U. Haupts, S. Maiti, P. Schwille and W.W. Webb, “Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, (1998), 13573-13578.
- [Hazuda 2000] D.J. Hazuda, P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J.A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabrielsky, W. Schleif, C. Blau and M.D. Miller, “Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells”, *Science* **287**, (2000), 646-50.
- [Hertzberg 1989] R.P. Hertzberg, M.J. Caranfa, S.M. Hecht, “On the mechanism of the topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex ”, *Biochemistry* **28**, (1989), 4629-4638.
- [Hsiang 1989] Y.H. Hsiang, M.G. Lihou, and L.F. Liu, “Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin”, *Cancer Research* **49**, (1989), 5077-5082.

- [Huang 1995] C.T. Huang, F.P. Yu, G.A. MacFeters and P.S. Stewart, "Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection", *Applied and Environmental Microbiology* **61**, (1995), 2252-2256.
- [Hungerford 1996] G. Hungerford and D.J.S. Birch, "Single-photon timing detectors for fluorescence lifetime spectroscopy", *Meas. Sci. Technol.* **7**, (1996), 121-135.
- [Janin 1985] J. Janin, "Déclin de fluorescence", *Méthodes biophysiques pour l'étude de macromolécules*, Hermann, (1985), 169-170.
- [Jaxel 1989] C. Jaxel, K.W. Kohn, M.C. Wani, M.E. Wall and Y. Pommier, "Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity", *Cancer Research* **49**, (1989), 1465-1469.
- [Jaxel 1991] J. Jaxel, G. Capranico, D. Kerrigan, K. Kohn, Y. Pommier, "Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin", *Journal of Biological Chemistry* **266**, (1991), 20418.
- [Jung 1998] G. Jung, J. Wiehler, W. Göhde, TH. Basche, B. Steipe and C. Bräuchle, "Confocal microscopy of single molecule of the green fluorescent protein", *Bioimaging* **6**, (1998), 54-61.
- [Kaiser 1961] W. Kaiser and C.G.B. Garrett, "Two-photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ ", *Physical Review Letters* **7**, (1961), 229-231.
- [Keating 1990] S.M. Keating and T.G. Wensel, "Nanosecond fluorescence microscopy: emission kinetics of Fura-2 in single cells", *Biophysical Journal* **59**, (1990), 186-202.
- [Kemnitz 2001] K. Kemnitz, "Picosecond fluorescence lifetime imaging spectroscopy as a new tool for 3D structure determination of macromolecule in living cells", in *New trends in fluorescence spectroscopy*, édition Springer Series on Fluorescence, édité par B. Valeur et J.C. Brochon, (2001), chap 18, 381-409.
- [Kino 1995] G.S. Kino, "Intermediate optics in Nipkow disk microscope", in the *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London, 1995, Chap 10, 155-165.
- [Klonis 1996] N. Klonis and W.H. Sawyer, "Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution", *Journal of fluorescence* **6**, (1996), 147-157.
- [Koester 1999] H.J. Koester, D. Baur, R. Uhl and S.W. Hell, " Ca^{2+} fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage", *Biophysical Journal* **77**, (1999), 2226-2236.

- [König 1996a] K. König, U. Simon and K.J. Halbhauer, "3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope", *Cellular and Molecular Biology* **42**, (1996), 1181-1194.
- [König 1996b] K. König, P.T.C. So, W.W. Mantulin, B.J. Tromberg and E. Gratton, "Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress", *Journal of Microscopy* **183**, (1996), 197-204.
- [Kusumi 1991] A. Kusumi, A. Tsuji, M. Murata, Y. Sako, A.C. Yoshizawa, S. Kagiwada, T. Hayakawa and S.I. Ohnishi, "Development of a streak-camera-based time-resolved microscope fluorimeter and its application to studies of membrane fusion in single cells", *Biochemistry* **30**, (1991), 6517-6527.
- [Lappin-Scott 1995] H.M. Lappin-Scott and J.W. Costerton, "Microbial biofilms" in *Plant and Microbial Biotechnology Research Series 5*, (Cambridge University Press, 1995).
- [Lakowicz 1983a] J.R. Lakowicz, "Introduction to Fluorescence" in *Principle of Fluorescence*, Plenum Press New-York, (1983), Chap1, 3-15.
- [Lakowicz 1983b] J.R. Lakowicz, "Measurement of fluorescence lifetimes" in *Principle of Fluorescence*, Plenum Press New-York, (1983), Chap3, 52-93.
- [Lakowicz 1983c] J.R. Lakowicz, "Energy transfer" in *Principle of Fluorescence*, Plenum Press New-York, (1983), Chap10, 303-339.
- [Lawrence 1991] J.R. Lawrence, D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton and D.E. Caldwell, "Optical sectioning of microbial biofilm", *Journal of Bacteriology* **173**, (1991), 6558-6567.
- [Lee 1991] S. Lee and J.F. Frank, "Inactivation of surface adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat", *Journal of Food Protection* **54**, (1991), 4-6.
- [Lewin 1990] B. Lewin, "Recombination and other topological manipulations of DNA" in *GENES IV* (Oxford University Press, 1990), Chap 32, 625-648.
- [Lindek 1995] S. Lindek, E.H.K. Stelzer and S.W. Hell, "Two-new high resolution confocal fluorescence microscopies (4Pi, Theta) with one- and two-photon excitation, in the *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London, 1995, Chap 26, 417-430.
- [Listgarten 1976] M.A. Listgarten, "Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopy study.", *J. Periodontol.* **47**, (1976), 1-18.

- [Lossau 1996] H. Lossau, A. Kummer, R. Heineke, F. Pöllingre-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C.M. Silva, M.M. Yang, D.C. Youvan, M.E. Michel-Beyerle, "Time-resolved spectroscopy of wild type and mutant green fluorescent protein reveals excited state deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions", *Chemical Physics* **213**, (1996), 1-16.
- [Mah 2001] T.C. Mah and G.A. O'Toole, "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agent", *Trends in Microbiology* **9**, (2001), 34-39.
- [Martin 1975] M.M. Martin and L. Lindquist, "the pH dependence of fluorescein fluorescence", *Journal of Luminescence* **10**, (1975), 381-390.
- [Marshall 1978a] A.G. Marshall, "Scattering phenomena", in *Biophysical Chemistry: principles, techniques and applications*, Ed John Wiley & Sons, Inc, (1978), chap15, 463-507.
- [Marshall 1978b] A.G. Marshall, "Light scattering: translational diffusion coefficients for macromolecules (or bacteria) in solution", in *Biophysical Chemistry: principles, techniques and applications*, Ed John Wiley & Sons, Inc, (1978), chap21, 721-733.
- [McClain 1977] W.M. McClain and R.A. Harris, "Two-photon molecular spectroscopy in liquids and gases", in *Excited States*, (Academic, New-York, 1977), 1-56.
- [Mekouar 1998] K. Mekouar, J.F. Muscadet, D. Desmaële, F. Subra, H. Leh, D. Savouré, C. Auclair and J. d'Angelo, " Styrylquinoline derivatives: a new class of potent HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in CEM cells ", *Journal of Medical Chemistry* **41**, (1998), 2846-2857.
- [Mertz 1995] J. Mertz, C. Xu, and W.W. Webb, "Single-molecule detection by two-photon excited fluorescence", *Optics Letters* **20**, (1995), 2532-2534.
- [Mertz 1998] J. Mertz, "Molecular photodynamics involved in multiphoton excitation fluorescence microscopy", *European Physical Journal D* **3**, (1998), 53-66.
- [Millard 1999] A.C. Millard, D.N. Fittinghoff, J.A. Squier, M. Müller and A.L. Gaeta, "Using GaAsP photodiodes to characterize ultrashort pulses under high numerical aperture focusing in microscopy", *J. Microsc.* **193**, (1999), 179-181.
- [Minoux 1983] M. Minoux, "Les méthodes quasi newtoniennes: principe général", dans *Programmation mathématique, théorie et algorithmes*, (Edition Dunod, 1983), Chap 4, p113-117.
- [Minsky 1957] M. Minsky, "microscopy apparatus", US Patent 3013467, 1957.

- [Minsky 1988] M. Minsky, "Memoir on inventing the confocal scanning microscope", *Scanning* **10**, 1988, 128-138.
- [Moertel 1972] C.G. Moertel, A.J. Schutt, R.J. Reitemeier, R.G. Hahn, "Phase II study of camptothecin in the treatment of advanced gastrointestinal cancer", *Cancer Chemother. Rep. I* **56**, (1972), 95-101.
- [Morton 1998] L.H.G. Morton, D.L.A. Greenway, C.C. Gaylarde and S.B. Surman, "Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides", *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**, (1998), 247-259.
- [Moulton 1986] P.F. Moulton, "Spectroscopic and laser characteristics of $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ ", *J. Opt. Soc. Am. B* **3**, (1986), 125-133.
- [Müller 1995] M. Müller, J. Squier, G.J. Brakenhoff, "Measurement of femtosecond pulses in the focal point of a high-numerical-aperture lens by two-photon absorption" *Opt. Lett.* **20**, n° 9, (1995), 1038-1040.
- [Nitiss 1988] J. Nitiss, J.C. Wang, "DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeas ", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, (1988), 7501-7505.
- [O'Connor 1979] D.V. O'Connor, W.R. Ware and J.C. Andre, "Deconvolution of fluorescence decay curve. A critical comparison of techniques", *Journal of Physical Chemistry* **83**, (1979), 1333-1343.
- [O'Connor 1984a] D.V. O'Connor and D. Phillips, "Time-Related Single Photon Counting", (Academic Press, 1984).
- [O'Connor 1984b] D.V. O'Connor and D. Phillips, "Pump and probes techniques", in Time-Related Single Photon Counting, (Academic Press, 1984), chap 1, paragraphe 1.5.4, 31-35.
- [O'Connor 1984c] D.V. O'Connor and D. Phillips, "Data analysis", in Time-Related Single Photon Counting, (Academic Press, 1984), chap 6, 159-210.
- [Ouali 2000] M. Ouali, C. Laboulais, H. Leh, D. Gill, D. Desmaële, K. Mekouar, F. Zouhiri, J. d'Angelo, C. Auclair, J.F. Muscadet, and M. Le Bret, "Modeling of the inhibition of retroviral integrases by styrylquinoline derivatives ", *Journal of Medical Chemistry* **43**, (2000), 1949-1957.
- [Palmer 1987] A.G. Palmer and M. Thompson, "Molecular aggregation characterized by high order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy", *Biophysical Journal* **49**, (1987), 809-815.
- [Patterson 2000] G.H. Patterson and D.W. Piston, "Photobleaching in two-photon excitation microscopy", *Biophysical Journal* **78**, (2000), 2159-2162.
- [Petran 1968] M. Petran, M. Hadravsky, M.D. Egger and R. Galambos, "Tandem scanning reflected light microscope", *Scanning* **7**, (1968), 97-108.

- [Piston 1994] D.W. Piston, M.S. Kirby, H. Cheng, W.J. Lederer and W.W. Webb, "Two-photon excitation of fluorescence imaging of three-dimensional calcium-ion activity", *Applied Optics* **33**, (1994), 662-669.
- [Politz 1998] J.C. Politz, E.S. Brown, D.E. Wolf and T. Pederson, "Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, (1998), 6043-6048.
- [Pommier 1995] Y. Pommier, G. Kohlhausen, K.W. Kohn, F. Leteurtre, M.C. Wani, M.E. Wall, "Interaction of an alkylating camptothecin derivative with a DNA base at topoisomerase I-DNA cleavage sites", *Proc. Natl. Sci. USA* **92**, (1995), 8861-8865.
- [Prasher 1992] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast and Cormier, "Primary structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent protein", *Gene* **111**, (1992), 229-233.
- [Ranka 1997] J.K. Ranka, A.L. Gaeta, A. Baltuska, M.S. Pshenichnikov and D.A. Wiersma, "Autocorrelation measurement of 6-fs pulses based on the two-photon-induced photocurrent in a GaAsP photodiode", *Optics Letters* **22**, n°17, (1997), 1344-1346.
- [Reid 1997] B.G. Reid and G.C. Flynn, "Chromophore formation in green fluorescent protein", *Biochemistry* **36**, (1997), 6786-6791.
- [Rigler 1993] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren and P. Kask, "Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion" *Eur. Biophys. J.* **22**, (1993), 169-175.
- [Risdale 1993] J.A. Risdale and W.W. Webb, "The viability of culture cells under two-photon laser scanning microscopy", *Biophysical Journal* **63**, (1993), 109-112.
- [Rost 1992] F.W.D. Rost, "Fluorescence: physics and chemistry", in *Fluorescence microscopy* vol 1, Cambridge University Press, (1992), 11-35.
- [Sala 1980] K.L. Sala, G.A. Kenney-Wallace and G.E. Hall, "CW autocorrelation measurements of picosecond laser pulses", *IEEE J. Quantum Electron.* **QE-16**, n°9, (1980), 990-996
- [Salin 1987] F. Salin, "Dispersion de vitesse de groupe: influence et compensation", thèse de l'Université Paris IX : *Etude et réalisation d'une chaîne laser femtoseconde. Rôle des phénomènes solitons dans les lasers femtosecondes à dispersion contrôlée*, ChapIII, (1987), 79-93.
- [Sanders 1995] R. Sanders, A. Draaijer, H.C. Gerritsen, P.M. Houpt and Y.K. Levine, "Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging", *Analytical Biochemistry* **227**, (1995), 302-308.

- [Slichenmyer 1993] W.J. Slichenmyer, E.K. Rowinsky, R.C. Donehower and S.H. Kaufmann, "The current status of camptothecin analogues as antitumor agents", *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, (1993), 271-291.
- [Schouffeten 1999] L. Schouffeten, P. Denjean, J. Faure and R. Pansu, "Photophysics of calcium green 1 *in vitro* and in live cells", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, (1999), 2463-2469.
- [Schwille 1997] P. Schwille, F.J. Meyer-Almes and R. Rigler, "Dual-color fluorescence cross correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution", *Biophysical Journal* **72**, (1997), 1878-1886.
- [Schwille 1999] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti and W.W. Webb, "Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation", *Biophysical Journal* **77**, (1999), 2251-2265.
- [Shafirovich 1999] V. Shafirovich, A. Dourandin, N.P. Luneva, C. Singh, F. Kirigin and N.E. Geacintov, "Multiphoton near-infrared femtosecond laser pulse-induced DNA damage with and without the photosensitizer proflavine", *Photochemistry and Photobiology* **69**, (1999), 265-274.
- [Shim 1991] S.C. Shim, D.W. Kim and M.S. Kim, *Journal of Photochem. Photobiol. A: Chem.* **56**, (1991), 227-.
- [Shimomura 1962] O. Shimomura, F.H. Johnson and Y. Saiga, "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *aequorea*", *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, (1962), 223-227.
- [So 1998] P.T.C. So, K. König, K. Berland, C.Y. Dong, T. French, C. Bühler, T. Ragan and E. Gratton, "New time-resolved techniques in two-photon microscopy", *Cellular and Molecular Biology* **44**, (1998), 771-793.
- [Spence 1991] D.E. Spence, P.N. Kean and W. Sibbett, "60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser", *Optics Letters* **16**, (1991), 42-46.
- [Steenkeste 2001] K. Steenkeste, E. Guiot, F. Tfibel, P. Pernot, F. Merola, P. Georges and M.P. Fontaine-Aupart, "Camptothecins-guanine interactions: mechanisms of charge transfer reaction upon photoactivation", à paraître dans *Journal of Chemical Physics*.
- [Stelzer 1995] H.E.K. Stelzer, "The intermediate optical system of laser-scanning confocal microscopy" in the *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London, 1995, Chap 9, 139-154.
- [Stewart 1998] P.S. Stewart, "A review of experimental measurements of effective diffusion permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms", *Biotechnology and Bioengineering* **59**, (1998), 261-272.

- [Stoodley 1994] P. Stoodley, D. DeBeer, and Z. Lewandowsky, "Liquid flow in biofilm systems", *Applied and Environmental Microbiology* **60**, (1994), 2711-2716.
- [Straub 1998] M. Straub and S.W. Hell, "Multifocal multiphoton microscopy: fast and efficient tool for 3-D fluorescence imaging", *Bioimaging* **6**, (1998), 177-185.
- [Swaminathan 1997] R. Swaminathan, C.P. Huang and A.S. Verkman, "Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent translational and rotational diffusion", *Biophysical Journal* **72**, (1997), 1900-1907.
- [Sytsma 1998] J. Sytsma, J. M. Vroom, C.J. De Grauw and H.C. Gerritsen, "Time-gated fluorescence lifetime imaging and microvolume spectroscopy using two-photon excitation", *Journal of Microscopy* **191**, (1998), 39-51.
- [Szmazinski 1996] H. Szmazinski and J.R. Lakowicz, "Sodium green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime", *Analytical Biochemistry* **250**, (1997), 131-138.
- [Terasaky 1995] M. Terasaky and M.E. Dailey, "Confocal microscopy of living cells", in the *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London, 1995, Chap 19, 327-346.
- [Terry 1995] B.R. Terry, E.K. Matthews and J. Haselhoff, "Molecular characterization of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy", *Biochemical and Biophysical Research Communication* **217**, (1995), 21-27.
- [Theilade 1976] J. Theilade, O. Fejerskov, M. Horsted, "A transmission electron microscopy study of 7-day old bacterial plaque in human tooth fissures", *Arch. Oral Biol.* **21**, (1976), 587-598.
- [Tsien 1998] R.Y. Tsien, "the Green Fluorescent Protein", *Annu. Rev. Biochem.* **67**, (1998), 509-544.
- [Valeur 1993] B. Valeur, "Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters" in *Molecular Luminescence Spectroscopy Part3*, Chemical Analysis Series Vol 77, John Wiley & Sons, (1993), chap 2, 25-84.
- [van Oss 1996] C.J. van Oss, "Forces interfaciales en milieux aqueux", (1996), Masson, Paris.
- [Volkmer 2000] A. Volkmer, V. Subramaniam, D.J.S. Birch and T.M. Jovin, "One-and Two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins", *Biophysical Journal* **78**, (2000), 1589-1598.

- [Vroom 1999] J.M. Vroom, K.J. De Grauw, H.C. Gerritsen, D.J. Bradshaw, P.D. Marsch, G.K. Watson, J.J. Birmingham and C. Allison, "Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy", *Applied and Environmental Microbiology* **65**, (1999), 3502-3511.
- [Wall 1966] M.E. Wall, M.C. Wani, C.E. Cook, K.H. Palmer, "The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*", *Journal of American Chemical Society* **88**, (1966), 3888-3890.
- [Widengren 1995] J. Widengren, U. Mets and R. Rigler, "Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study", *J. Chem. Phys.* **99**, (1995), 13368-13379.
- [Widengren 1998] J. Widengren and R. Rigler, "Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces", *Cellular and molecular biology* **44**, (1998), 857-879.
- [Widengren 1999] J. Widengren, B. terry and R. Rigler, "Protonation kinetics of GFP and FITC investigated by FCS- aspects of the use of fluorescent indictaors for measuring pH", *Chemical Physics* **3721**, (1999), 1-13.
- [Wokosin 1996] D.L. Wokosin, V. Centonze, J.G. White, D. Armstrong, G. Robertson, and A.I. Ferguson, "All-solid-state ultrafast laser facilitate multiphoton excitation fluorescence imaging", *IEEE Journal of selected topics in quantum electronics* **2**, n°4, (1996), 1051-1065.
- [Wood 2000] S.R. Wood, j. Kirkam, P.D. Marsh, R.C. Shore, B. Nattress and C. Robinson, "Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy", *Biomaterials and Bioengineering , Journal of dental research* **79**, (2000), 21-27.
- [Xia 1999] A.D. Xia, S. Wada, H. Tashiro and W.H. Huang, "One- and two-photon-induced fluorescence from recombinant green fluorescent protein", *Archives of Biochemistry and Biophysics* **372**, (1999), 280-284.
- [Xu 1996a] C. Xu, and W.W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross-sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm", *Journal of Optical Society of America B* **13**, n°3, (1996), 481-491.
- [Xu 1996b] C. Xu, W. Zipfel, J.B. Shear, R.M. Williams, and W.W. Webb, "Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear spectroscopy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, (1996), 10763-10768.
- [Yang 1996] F. Yang, L.G. Moss and G.N. Phillips, "The molecular structure of green fluorescent protein", *Nature Biotechnology* **14**, (1996), 1246-1251.

-
- [Yang 1998] D. Yang, J.T. Strode, H.P. Spielmann, A.H.J. Wang, T.G. Burke, “Interaction of two clinical camptothecin drugs with DNA stabilize their active lactone form”, *Journal of American Chemical Society* **120**, (1998), 2978-2980.
- [Zouhiri 2000] F. Zouhiri, J.F. Muscadet, K. Mekouar, D. Desmaële, D. Savouré, H. Leh, F. Subra, M. Le Bret, C. Auclair and J. d’Angelo, “ Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture”, *Journal of Medical Chemistry* **43**, (2000), 1533-1540.

Liste des publications et des communications à des conférences

Publications :

- E. Guiot, M. Enescu, B. Arrio, G. Johannin, G. Roger, S. Tosti, F. Tfibel, F. Mérola, A. Brun, P. Georges, M.P. Fontaine-Aupart, “**Molecular dynamics of biological probes by fluorescence correlation microscopy with two photon excitation**”, *Journal of Fluorescence* 10, 2000, 413-419.
- K. Steenkeste, E. Guiot, F. Tfibel, P. pernot, F. Merola, P. Georges, M.P. Fontaine-Aupart, “**Camptothecins-guanine interactions: mechanism of charge transfer reaction upon photoactivation**”, *Journal of Chemical Physics* 275, 1-16.
- E. Guiot, P. Georges, A. Brun, “**Microscopie de fluorescence par absorption à deux photons**”, article de vulgarisation dans *SupOptique Avenir* 2001.
- E. Guiot, P. Georges, A. Brun, F. Merola, B. Arrio, M.P. Fontaine-Aupart, M.N. Bellon-Fontaine, R. Briandet, “**Characterisation of the diffusion of fluorophores within microbial biofilms by fluorescence correlation microscopy under two-photon excitation**”, *SPIE proceeding (2001), vol 4431: photon migration, optical coherence tomography and microscopy*.
- E. Guiot, P. Georges, A. Brun, M.P. Fontaine-Aupart, M.N. Bellon-Fontaine and R. Briandet, “**Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation microscopy under two-photon excitation**”, à paraître dans *Journal of photochemistry Photobiology*.

Communications à des conférences :

- E. Guiot, M. Enescu, B. Arrio, G. Johannin, G. Roger, S. Tosti, F. Tfibel, F. Mérola, P. Georges, M.P. Fontaine-Aupart, “**Two photon excitation of biological fluorescent probes: single molecule detection by fluorescence correlation spectroscopy**”, poster, 6th conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy, Paris 12-15 septembre 1999.
- E. Guiot, P. Georges, A. Brun, F. Mérola, B. Arrio, S. Marze et M.P. Fontaine-Aupart, “**Microscopie de fluorescence par absorption biphotonique : étude dynamique de sondes biologiques par corrélation de fluorescence**”, Poster, *Colloque OptDiag* 2000, Paris, mai 2000.
- E. Guiot, P. Georges, A. Brun, G. Johannin, F. Mérola, B. Arrio, and M.P. Fontaine-Aupart, “**Fluorescence correlation microscopy by two-photon excitation : investigation of biological probes at the single molecule level**”, conférence orale, *CLEO Europe*, Nice, 10-15 septembre 2000.
- E. Guiot, P. Georges, A. Brun, F. Mérola, B. Arrio, M.P. Fontaine-Aupart, M.N. Bellon-Fontaine and R. Briandet, “**Fluorescence correlation microscopy by two-photon excitation: application to the characterisation of microbial biofilms**”, poster, *Spring School on ultrafast technology and advanced microscopy applications to intra-cellular and biomolecular dynamics*, Cargese, 25-31 mars 2001.

-
- E. Guiot, P. Georges, A. Brun, F. Mérola, B. Arrio, M.P. Fontaine-Aupart, M.N. Bellon-Fontaine and R. Briandet, “**Characterisation of the diffusion of fluorophores within microbial biofilms by fluorescence correlation microscopy**”, conférence orale, *European Conference on Biomedical Optic*, Munich, 15-21 juin 2001.