

Nouvelles techniques d'imagerie laser

Les chimistes utilisent depuis longtemps les interactions avec la lumière pour observer et caractériser les milieux organiques ou inorganiques. La présence, dans la matière, de sites **optiquement actifs**, naturellement émetteurs de lumière, est à l'origine des méthodes de microscopie optique et d'imagerie.

Ces méthodes, historiquement antérieures aux méthodes de spectroscopies infrarouge ou visibles-UV (où l'on mesure l'absorption de l'échantillon étudié en fonction de la longueur d'onde d'un faisceau lumineux incident), connaissent à l'heure actuelle de nouveaux développements. On peut attribuer ces progrès en grande partie à l'avènement des sources laser et aux phénomènes d'**absorption à deux photons (ADP)** (ou phénomènes dits « biphotoniques »), auxquels leurs considérables intensités lumineuses (mille à cent mille fois supérieures – en énergie instantanée – aux sources classiques) donnent naissance.

L'apparition de ces nouvelles méthodes, les **microscopies biphotoniques**, que les chimistes savent adapter aux systèmes biologiques moléculaires, et leur perfectionnement constant, ouvrent de nouvelles voies vers la compréhension toujours plus fine des phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire, au sein de l'organisme vivant (nos tissus, nos cellules). Ce chapitre en donne quelques exemples.

1 Avantages de la microscopie biphotonique et comment les optimiser

L'excitation biphotonique, dépendant fortement de l'intensité lumineuse, ne se produit en pratique qu'au point où celle-ci est maximum – c'est-à-dire au **point focal** d'un montage d'illumination. La **Figure 1** illustre bien ce point : en éclairage à un photon à 488 nm de longueur d'onde, l'ensemble du trajet du faisceau est rendu visible

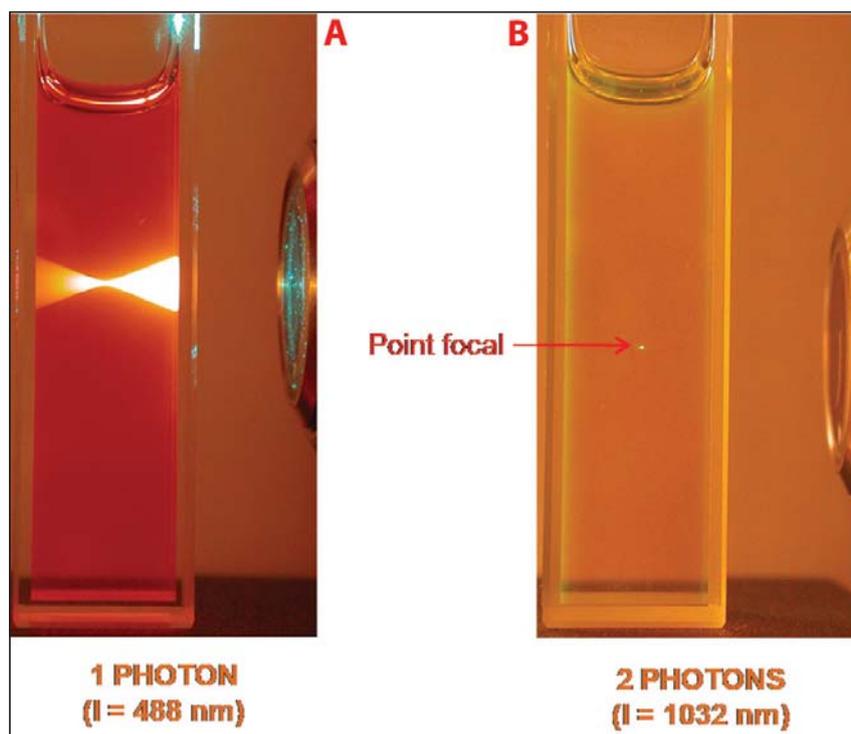


Figure 1

Contrastes en excitation mono- ou biphotonique. Dans le premier cas (A), l'ensemble des molécules situées sur le parcours optique sont émettrices de fluorescence. Dans le second cas (B), seul le point focal, où la lumière excitatrice est intense, est émetteur. l est la longueur d'onde incidente du rayon lumineux généré par un laser et focalisé dans la cuve par passage à travers l'objectif du microscope (visible à droite sur l'image).

par **fluorescence** alors qu'en excitation par deux photons à 1032 nm de longueur d'onde, seul le point focal émet la fluorescence.

Cette propriété ouvre à la microscopie biphotonique la possibilité de réaliser des images en trois dimensions, par un jeu de translation de l'objectif qui permet au point focal de balayer l'échantillon selon son axe, et de réaliser ainsi de véritables « coupes optiques ». La longueur d'onde excitatrice étant située dans le rouge ou l'infrarouge du spectre lumineux (entre 700 et 1100 nm), et non dans l'ultra-violet, elle aura une bien meilleure pénétration dans les tissus vivants et pourra en fournir une image plus complète.

Qualifiée d'imagerie douce, cette microscopie biphotonique permet par ailleurs d'éviter les photodommages, tels que l'altération de la peau ou de l'ADN pouvant survenir lors d'expositions aux UV ;

mais elle évite également l'autofluorescence (fluorescence des régions voisines qui interfèrent avec le signal principal). En effet, comme la longueur d'onde incidente ne peut produire que peu d'effets à un photon, on peut exposer des tissus biologiques plus longtemps et sans dommages pour ces derniers, et limiter le bruit de fond dû à la fluorescence naturelle, pour obtenir ainsi des gains de sensibilité appréciables.

La microscopie biphotonique est une technique d'imagerie douce, qui permet d'obtenir de bonnes qualités d'images de coupes des tissus et cellules vivants, grâce à une bonne pénétration de la lumière.

Une fois les caractéristiques de cette technique spécifiées de manière qualitative, se pose le problème de la quantification du phénomène d'absorption simultanée de deux photons. Alors que, dans le cas d'un photon, la réponse de la molécule excitée à une longueur d'onde donnée est mesurée par le **coefficient d'extinction molaire**, en absorption à deux photons (ADP), elle est mesurée par la **section efficace ADP** dont l'unité de mesure est le Göppert-Mayer (GM), du nom de la première physicienne à avoir envisagé la possibilité de l'absorption à deux photons (**Figure 2**).

Pour faire de l'imagerie par absorption à deux photons, on a donc besoin de bonnes

sections efficaces d'ADP et de bons **rendements quantiques de fluorescence**. On introduit alors une grandeur, la **brillance à deux photons**, qui est le produit des deux grandeurs précédentes. Si cette brillance est importante dans la plage de longueur d'onde qui nous intéresse, la molécule sera observable par la microscopie biphotonique.

Dans l'étude des systèmes biologiques, on cherchera à atteindre de fortes brillances dans la gamme de longueurs d'onde allant de 700 nm à 1100 nm. Pour ce faire, on pourra utiliser des molécules aux propriétés émettrices efficaces – des **chromophores** biphotoniques – et les introduire dans le système à étudier pour en accroître la réponse.

1.1. Le rôle du chimiste dans le développement de ces nouvelles techniques

L'utilisation de ces nouvelles techniques optiques requiert ainsi au premier chef l'intervention de chimistes, qui vont concevoir et réaliser des **chromophores** appropriés aux diverses études entreprises.

Des expériences montrent que les meilleurs des chromophores **endogènes** comme la riboflavine¹ ont des sections efficaces d'ADP de l'ordre de 1 GM. Par conséquent pour que l'ADP ne produise pas de dommages sur le système

1. La riboflavine, encore appelée vitamine B2 (apportée par les laitages, viandes et poissons), est une molécule largement présente dans notre organisme (intestins, cœur, cerveau) où elle joue un rôle important.

biologique, il faut produire des chromophores synthétiques antennés, ayant une section efficace d'ADP largement supérieure à celle des tissus biologiques (et donc des chromophores endogènes), soit environ 1 000 GM et au-delà.

Cela permet alors une sélectivité d'excitation importante, les molécules non synthétiques étant alors non affectées par l'irradiation. De plus, ces chromophores synthétiques doivent être de petite taille pour pouvoir s'insérer dans le milieu biologique et permettre d'en faire l'image.

À l'heure actuelle, les **fluorophores** commerciaux ne répondent pas à ces objectifs et ne permettent pas de bénéficier des effets de sélectivité de l'absorption à deux photons. Le chimiste va donc se fixer, pour définir et réaliser les chromophores adaptés, le cahier des charges suivant :

- rendement quantique de fluorescence élevé ;
- section efficace d'ADP très élevée dans la gamme 700 à 1100 nm ;
- molécule non excitable par un seul photon dans cette même gamme, car le monophotonique nécessitant moins d'énergie l'emporterait sur le biphotonique.

Si ces critères sont bien remplis, on obtient alors :

- une image en 3D ;
- une sensibilité plus élevée ;
- une réduction des photodommages pour le milieu environnant.

L'ingénierie moléculaire pour l'absorption à deux photons a mis en évidence les



Figure 2

Maria Göppert-Mayer obtint le prix Nobel de physique en 1963. C'est en 1929, au cours de sa thèse en physique, qu'elle démontra théoriquement l'existence de l'absorption à deux photons. Ce phénomène fut mis en évidence seulement trente ans après, lors de l'apparition des lasers.

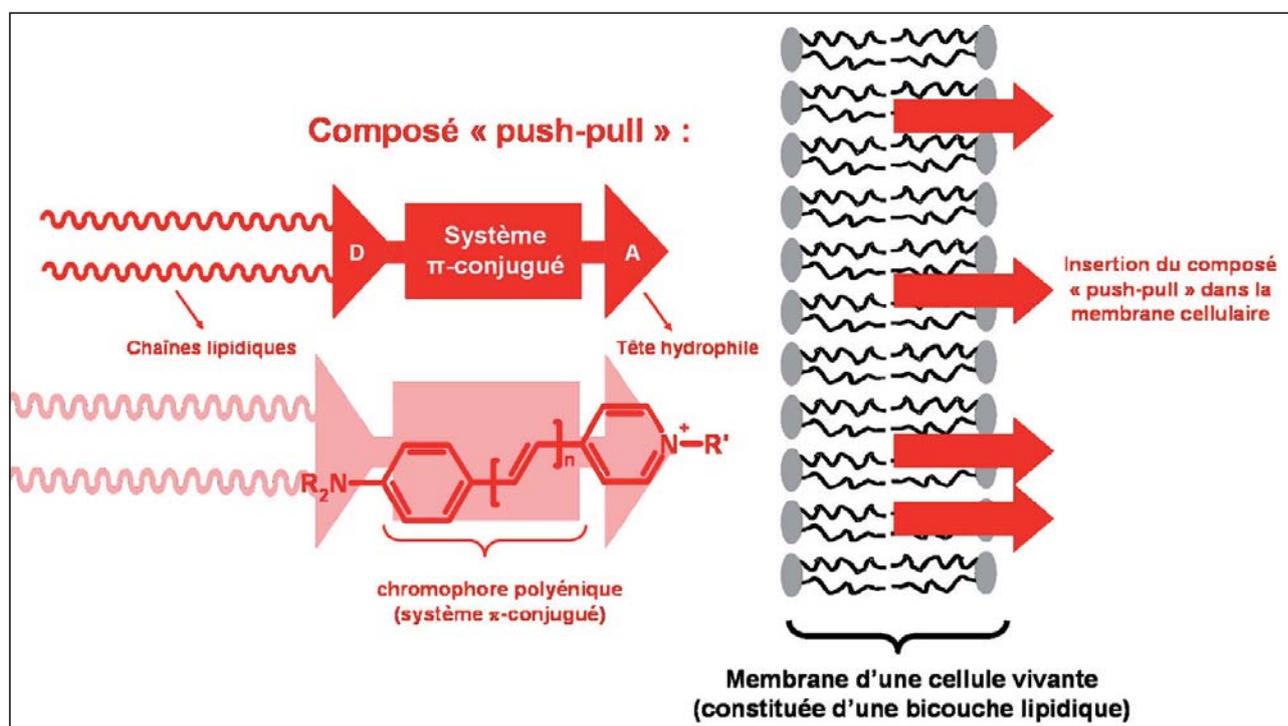
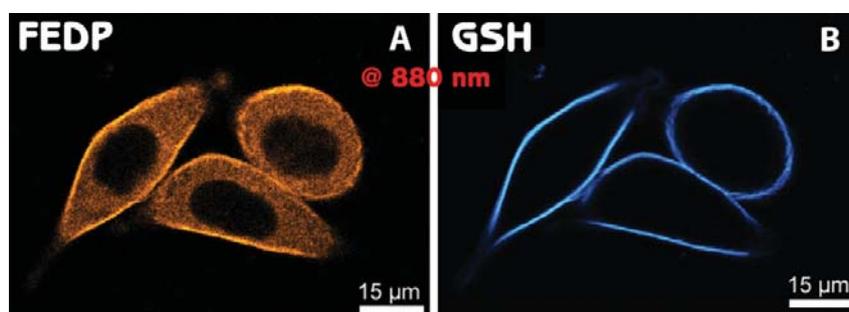


Figure 3

Chromophores et ingénierie moléculaire. L'étude optique montre l'intérêt de la présence d'un groupe donneur d'électrons (D) séparé d'un groupe accepteur d'électrons (A) par un système π -conjugué, conduisant à des composés dits « push-pull ». La présence de chaînes lipidiques sur le motif donneur et d'une charge (positive) sur le motif accepteur permettent au chromophore de s'insérer dans les zones membranaires de la cellule, et favorisent une orientation particulière au sein de cette membrane (flèche rouge).

Figure 4

Images simultanées obtenues par émission de fluorescence à deux photons (A) ou par GSH (B, et voir l'encart « La spectroscopie à deux photons »). Les chromophores fluorescents rentrent dans les cellules, mais seuls les chromophores orientés dans la membrane donnent une image GSH.



principales corrélations entre structure moléculaire et efficacité en ADP. Ainsi, on sait que pour des molécules de type quadripôles (assemblage symétrique de deux dipôles), la réponse à deux photons est élevée, et que la gamme de réponse de la molécule synthétisée peut être ajustée à la gamme d'intérêt biologique (700 nm à 1 100 nm). On montre aussi, autre exemple, l'intérêt des chromophores dits « push-pull » (Figure 3).

L'ingénierie moléculaire a notamment permis d'accéder à des systèmes répondant au cahier des charges établi plus haut et présentant des sections efficaces d'ADP dépassant 5000 GM à certaines longueurs d'onde, et supérieure à 1 000 GM sur une large plage de la gamme spectrale d'intérêt biologique

(700 à 1 000 nm). En outre, comme on le souhaite, la fluorescence est importante à toutes ces longueurs d'onde.

La synthèse de **fluorophores** de pointe conçus selon ces principes a permis de visualiser les régions membranaires dans les échantillons biologiques cellulaires (Figure 4).

1.2. Vers des sondes biphotoniques ?

La microscopie par observation de la lumière émise par fluorescence révèle la répartition des molécules émettrices présentes dans l'échantillon étudié et permet ainsi d'analyser les systèmes hétérogènes comme ceux présents chez le vivant.

On peut aussi concevoir des molécules émettrices dont l'efficacité dépend d'un paramètre physico-chimique local. La cartographie fera alors ressortir les zones de l'échantillon où ces paramètres ont les valeurs particulières appelées par le phénomène utilisé, qu'il s'agisse de fluorescence ou de GSH (Encart « La spectroscopie à deux photons »), et différentes dans les deux cas.

LA SPECTROSCOPIE À DEUX PHOTONS

Les intensités lumineuses gigantesques (des gigawatts instantanés) que peut atteindre la lumière produite par les lasers, en particulier par ceux qui délivrent la lumière par brèves impulsions (de durées inférieures à quelques nanosecondes), permettent d'observer des phénomènes d'absorption à deux photons, inobservables avec les sources lumineuses classiques.

Avec ces dernières, l'interaction de la lumière avec une molécule se fait par transitions monophotoniques : l'énergie d'un photon est transférée du faisceau lumineux incident à la molécule, qui est ainsi portée dans un état excité d'énergie supérieure à son état fondamental par une quantité d'énergie égale à celle d'un photon. C'est ce phénomène de base qui est utilisé par les méthodes traditionnelles de microscopie ou d'imagerie, ainsi que des méthodes d'études spectroscopiques. Avec de très grandes intensités lumineuses, le transfert simultané de l'énergie de deux photons (biphotonique) du faisceau lumineux à la molécule peut intervenir par un processus non-linéaire. De même que l'on parle classiquement d'absorption par processus monophotonique (qu'on abrège en « absorption ») de la lumière, on peut par conséquent parler d'absorption à deux photons (*Figure 5*).

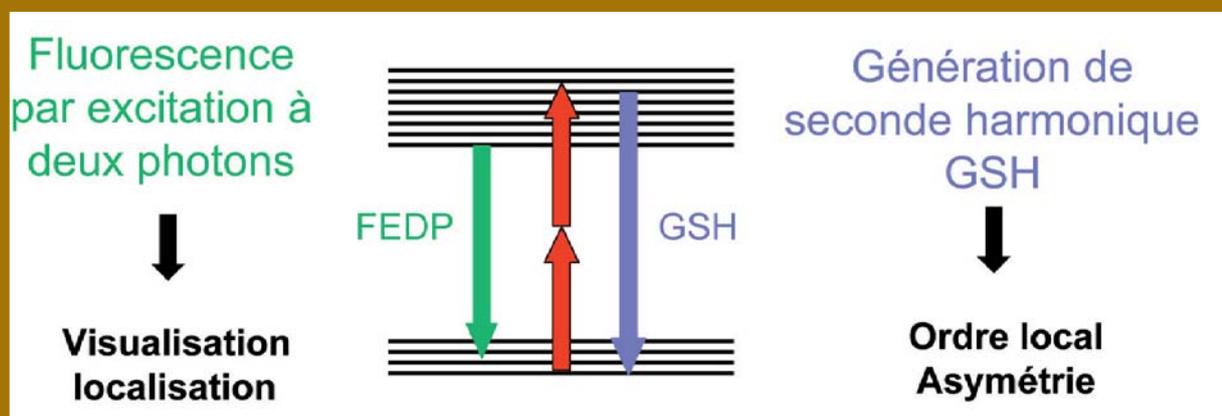


Figure 5

Multiphotonique : imagerie combinée. La figure résume les transferts d'énergie qui prennent place dans l'interaction biphotonique. Le faisceau incident (flèches rouges) porte la molécule dans un état électronique excité par transfert de deux photons. Le retour à l'état fondamental se fait par l'un ou l'autre des deux mécanismes qui donnent chacun naissance à une émission lumineuse caractéristique : la fluorescence (en vert) et la « génération de seconde harmonique » (GSH) (en violet).

Dans le phénomène de fluorescence, le retour à l'état fondamental après excitation se fait par émission (en vert sur la figure) d'un photon d'énergie un peu inférieure à celle du photon incident photonique (dans le processus monophotonique) ou de deux photons incidents (en rouge sur la *Figure 5*) dans le cas de l'absorption biphotonique (FEDP) : c'est le phénomène de la fluorescence. Le décalage entre la longueur d'onde de la lumière émise par fluorescence et celle, un peu plus courte, de la lumière excitatrice, traduit qu'un très rapide réarrangement des atomes au sein de la molécule (dénommé « relaxation ») a dissipé une (petite) quantité d'énergie entre excitation et émission.

Le phénomène de **génération de seconde harmonique** (GSH), bien que produit par la même excitation de base, est de nature différente. Il a d'abord été découvert dans l'étude optique de cristaux d'oxydes métalliques qu'une émission d'un faisceau lumineux de longueur d'onde moitié (seconde harmonique) de celle du faisceau incident (énergie de photon double) pouvait prendre place dans une direction bien définie de l'espace, déterminée par les propriétés du cristal. L'étude de ce phénomène, aujourd'hui largement utilisé en optique non-linéaire, a montré que son intensité dépend étroitement à la fois des propriétés d'ensemble de

l'arrangement des atomes dans le cristal et des propriétés électriques du milieu. L'application de ce phénomène aux systèmes biologiques a représenté une approche hardie, compte tenu des différences intrinsèques entre les milieux, mais qui se révèle très prometteuse. L'ordre très local des systèmes moléculaires biologiques permet en effet de conserver certaines des propriétés optiques observées dans les cristaux, malgré l'absence d'ordre à longue distance, et une production significative de seconde harmonique. Les informations que l'on tire de son étude sont alors précisément de caractérisation de cet ordre local ; c'est en particulier le cas dans les systèmes membranaires, sans surprise, vu leur organisation spatiale poussée.

Les deux phénomènes de **fluorescence** et de **génération de seconde harmonique** interviennent simultanément consécutivement à l'excitation lumineuse. Ils correspondent chacun à l'émission de photons de longueurs d'onde différentes (la moitié de la longueur d'onde incidente pour la GSH, déplacée vers les plus grandes longueurs d'onde pour l'émission de fluorescence). Ils peuvent donc être étudiés séparément sans interférence de l'un vers l'autre, par l'utilisation de détecteurs sélectifs en longueur d'onde.

Les chromophores correspondants jouent alors le rôle de sonde pour les valeurs de ces paramètres. On peut donner les exemples suivants.

1.2.1. Les sondes biphotoniques de pH

Les sondes de pH biphotoniques permettent de connaître avec précision la concentration en protons H⁺ à proximité de certaines molécules. Le principe consiste à utiliser la

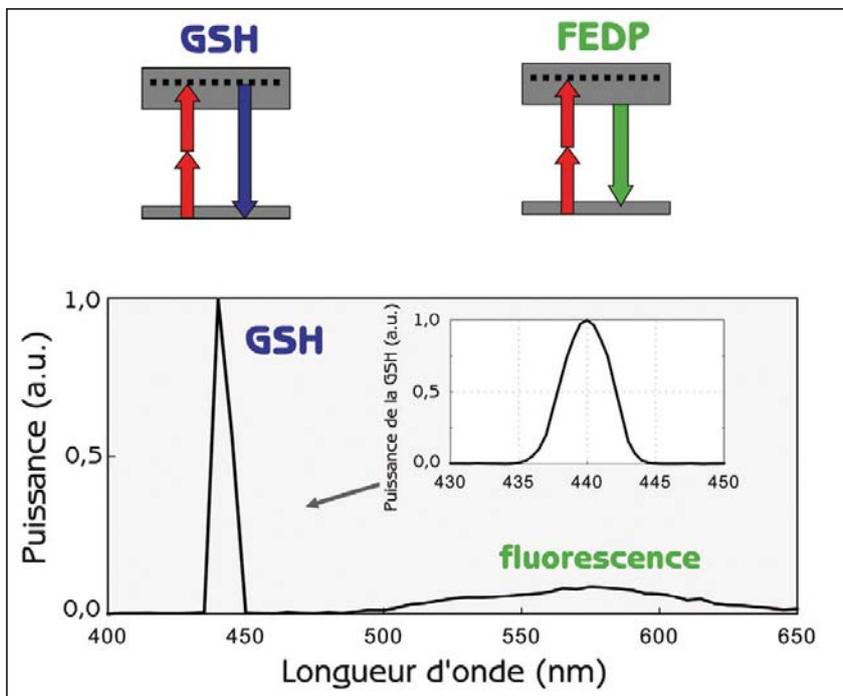
variation de la section efficace d'ADP entre le cas où la molécule est protonée et déprotonée, et d'en faire la traduction au niveau du pH².

1.2.2. Les sondes de potentiel (voltmètres moléculaires)

Par ailleurs, la génération de seconde harmonique (GSH), qui est un phénomène simultané à l'émission de fluorescence (**Encart « La spectroscopie à deux photons »**), a permis de développer des sondes de potentiel. La GSH consiste en l'arrivée simultanée de deux photons sur la même molécule qui se « combinent » pour en produire un troisième d'énergie double (et donc de longueur d'onde moitié). L'absorption à deux photons permet de sonder et de localiser le milieu étudié grâce au phénomène de fluorescence, tandis que la GSH permet de connaître l'ordre local du système. Le même chromophore réémet alors

Figure 6

Principe des émissions consécutives à l'excitation biphotonique, la fluorescence et la seconde harmonique, et un exemple de leur détection.



2. Rappelons que le potentiel hydrogène est défini par : $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$, [H⁺] étant la concentration en protons.

deux signaux différents, celui de l'émission de fluorescence et celui de la seconde harmonique, qui donnent des informations complémentaires sur le système étudié (Figure 6).

Cependant une limite importante existe pour pouvoir observer la GSH. En effet, il est nécessaire de travailler avec des molécules asymétriques, qui de plus s'organisent de manière asymétrique. Pour faire de l'imagerie combinée, on a besoin de travailler sur des systèmes pour lesquels les deux phénomènes (ADP et GSH) se produisent de manière importante. Des systèmes répondant bien à ces deux types d'excitation sont les chromophores dits « push-pull » (Figure 3).

Sensible à l'ordre local, la GSH est une technique de mesure des distances inter-membranaires difficilement accessibles jusque-là (Figure 7). Par ailleurs, le phénomène de GSH permet également de mesurer le potentiel électrique en tout point d'une membrane et par conséquent

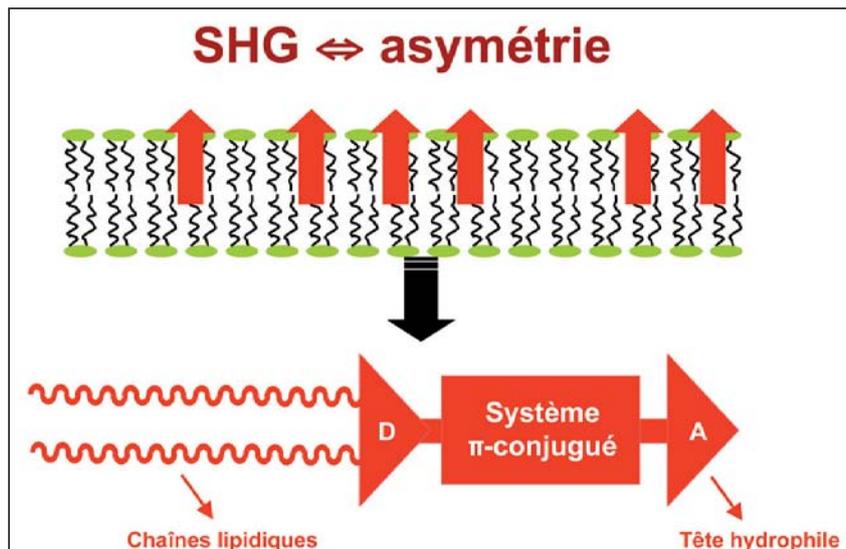


Figure 7

Modèle de l'arrangement des chromophores permettant de visualiser les membranes des cellules vivantes par analyse de la GSH. Cela permet de réaliser une imagerie dynamique des processus membranaires.

de connaître l'activité électrique cellulaire³. Le principe repose sur le fait que l'intensité du signal de GSH varie avec le potentiel. Le suivi de la variation de cette intensité dans le temps permet alors de suivre en direct la variation de potentiel en tout point de la membrane puisqu'on a une image 3D (Figure 8).

3. Rappelons que nos cellules vivantes sont en activité permanente, et de nombreux flux de molécules et d'ions ont lieu de part et d'autre des membranes cellulaires, générant une activité électrique.

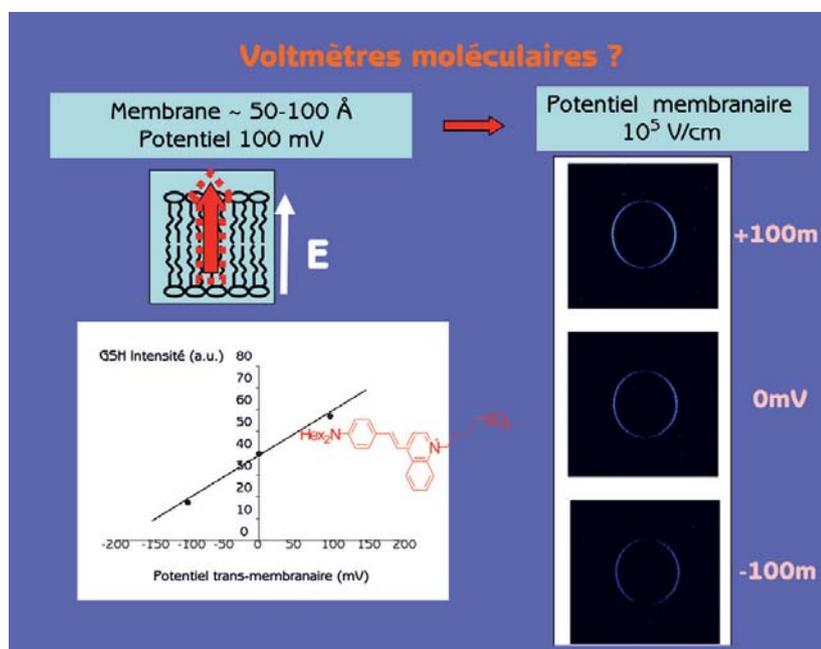


Figure 8

L'intensité du signal de GSH généré au niveau de la membrane de modèles simplifiés de cellules varie linéairement avec le potentiel électrique. Les molécules introduites dans le milieu et qui génèrent ce signal (telles que celle représentée ici) se comportent donc comme de véritables voltmètres membranaires. Ceci permet d'envisager leur utilisation pour le suivi spatio-temporel de l'activité électrique de véritables cellules.

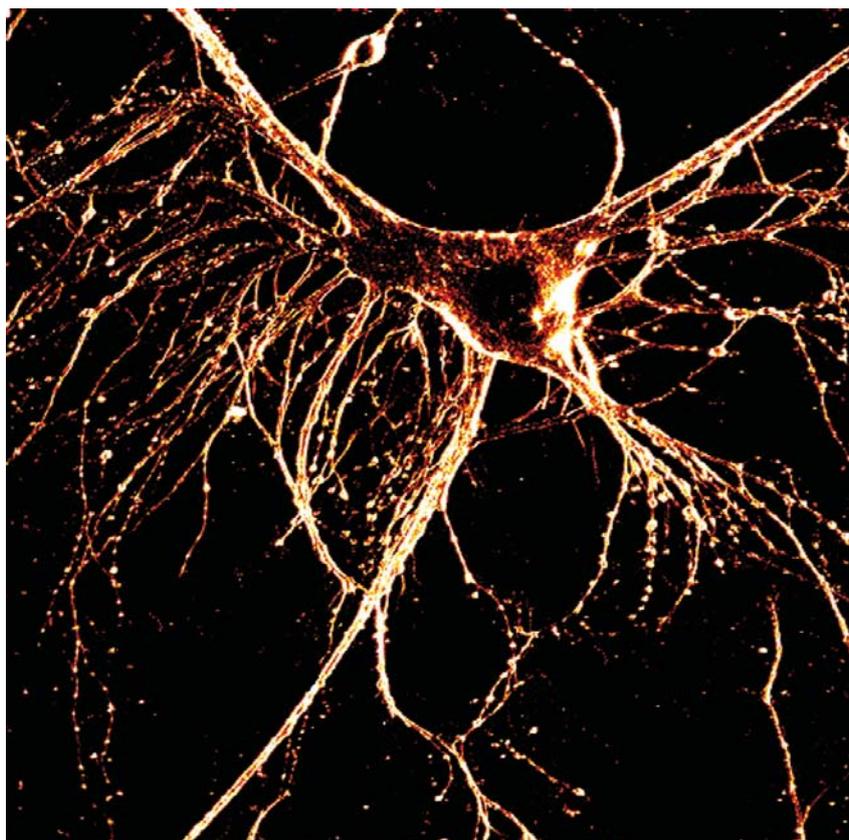


Figure 9

L'imagerie biphotonique par observation de la GSH permet de visualiser des réseaux neuronaux. Un exemple est donné ici avec l'image de neurones de culture (aplysie) marqués avec des molécules adaptées (« voltmètres membranaires ») et imagé par GSH. La longueur d'onde employée pour réaliser cette image (940 nm) permet de s'affranchir des effets de photodommages et de pouvoir voir « en profondeur » grâce à une meilleure pénétration dans les tissus. Collaboration D. Dombeck, W.W. Webb (Cornell).

Des tests effectués sur des modèles simplifiés de cellules montrent que l'intensité de GSH varie très sensiblement avec le potentiel électrique et ceci de manière très rapide (*i.e.* en temps réel). Ces molécules constituent donc de véritables voltmètres moléculaires de nos cellules !

Ces propriétés ont été appliquées au suivi spatio-temporel de l'activité électrique de cellules neuronales avec une excellente résolution spatiale (inférieure au micromètre) et temporelle (inférieure à la milliseconde) (**Figure 9**).

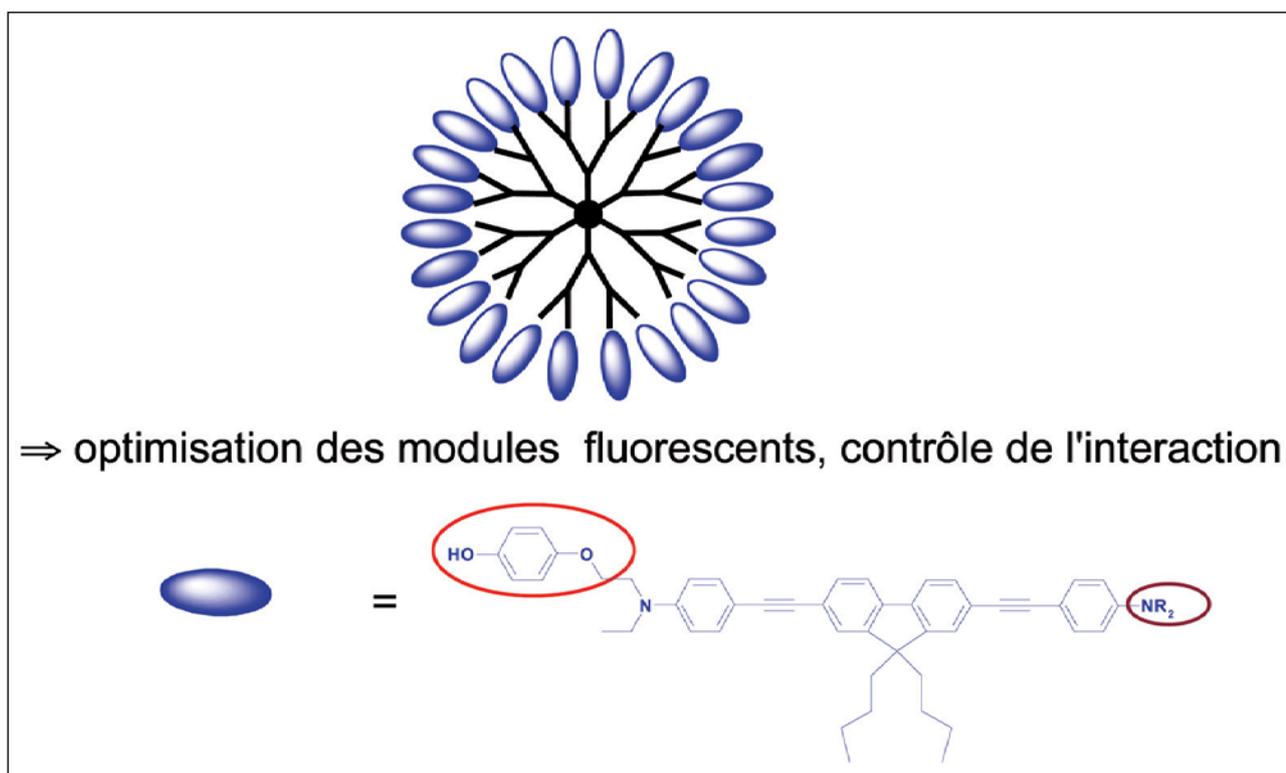
2 Des nanosondes entièrement organiques pour de nouvelles percées en imagerie

Les objets nanométriques les plus populaires à l'heure actuelle notamment pour leur

utilisation en imagerie biologique sont les « **quantum dots** » (ou points quantiques). Ces nano-objets, à base de semi-conducteurs, présentent l'avantage d'être extrêmement brillants et robustes. Ils existent de plus dans toute une palette de tailles et de couleurs différentes. Ils présentent toutefois l'inconvénient d'inclure dans leur structure des métaux lourds (comme par exemple le cadmium), ce qui pose un problème de toxicité et restreint leur utilisation pour l'imagerie médicale et dans le domaine de la santé humaine. Cela soulève également le problème de leur biodégradabilité et du risque écologique associé aux rejets dans l'environnement.

Face à cette problématique, la recherche s'est orientée vers l'élaboration de substituts des quantum dots à travers la réalisation de nano-objets « mous » (par rapport au caractère « dur » des nanoparticules les plus classiques), et construits à partir de modules complètement organiques. Il s'agissait de concevoir des alternatives à la fois bio- et éco-compatibles aux quantum dots, et que l'on puisse à terme utiliser pour l'imagerie médicale. Et ceci en arrivant à atteindre le même niveau de performances techniques (en termes de brillance notamment) que les quantum dots.

L'idée pour accéder à de tels objets a consisté à confiner au sein de nanoparticules organiques un grand nombre de fluorophores, la cohésion de l'objet synthétisé étant assurée par des liaisons chimiques. Pour parvenir à une telle réalisation, il fallait néanmoins surmonter



deux difficultés techniques importantes. La première est d'arriver à fixer les chromophores de manière efficace et contrôlée sur une plateforme de taille nanométrique. La seconde est de parvenir à ce que le confinement dans la nanoparticule ne diminue pas la **luminescence** des chromophores.

Après de nombreux travaux de recherche, ces difficultés techniques ont enfin pu être surmontées grâce à l'utilisation de nouveaux objets chimiques, les **dendrimères**, molécules globulaires ramifiées aisément modulables à

la masse désirée et auxquelles on peut fixer les chromophores souhaités (**Figures 10 et 11**).

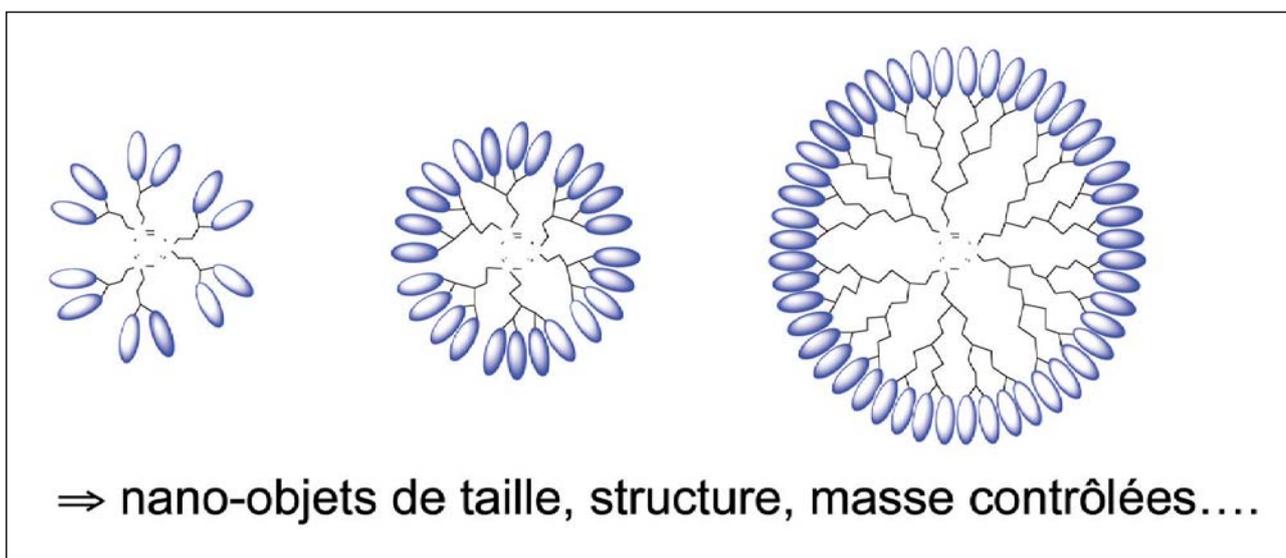
La fluorescence des chromophores introduits dans le dendrimer est essentiellement conservée et, au total, la réponse à l'excitation augmente de façon linéaire avec le nombre de chromophores du dendrimer (donc exponentielle avec leur taille). On peut de cette façon obtenir des images d'objets difficiles à visualiser avec d'autres chromophores inaccessibles aux techniques monophotoniques (**Figure 12**).

Figure 10

Une voie modulaire vers les nanodots organiques ? Le dendrimer est une molécule constituée par l'assemblage en symétrie globulaire de fragments rayonnants. On peut fixer des chromophores sur les éléments rayonnants, réalisant ainsi un « nanodot » tout organique.

Figure 11

Les nanodots : une approche modulaire. La taille des dendrimères, d'après leur conception même, peut être ajustée et permet d'obtenir des nano-objets luminescents efficaces pour toute une variété d'applications [1].



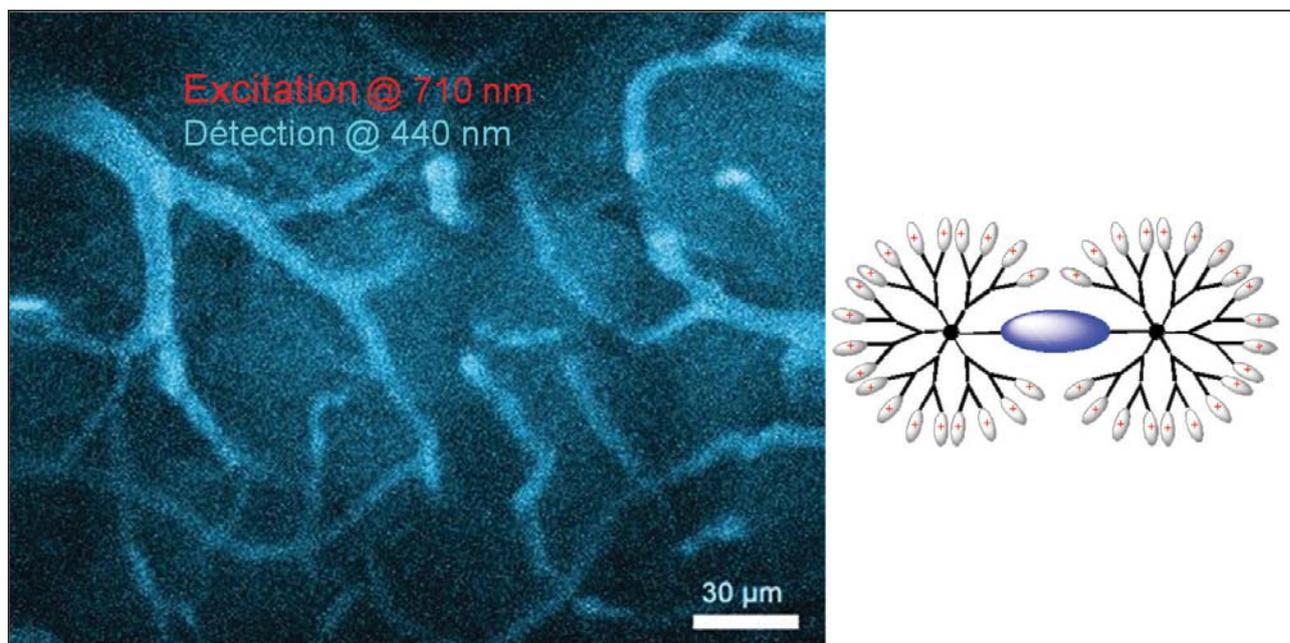


Figure 12

Image d'un réseau vasculaire obtenu in vivo par l'injection de nanodots organiques [2]. Collab. S. Charpak, L. Moreaux (INSERM, Paris Descartes).

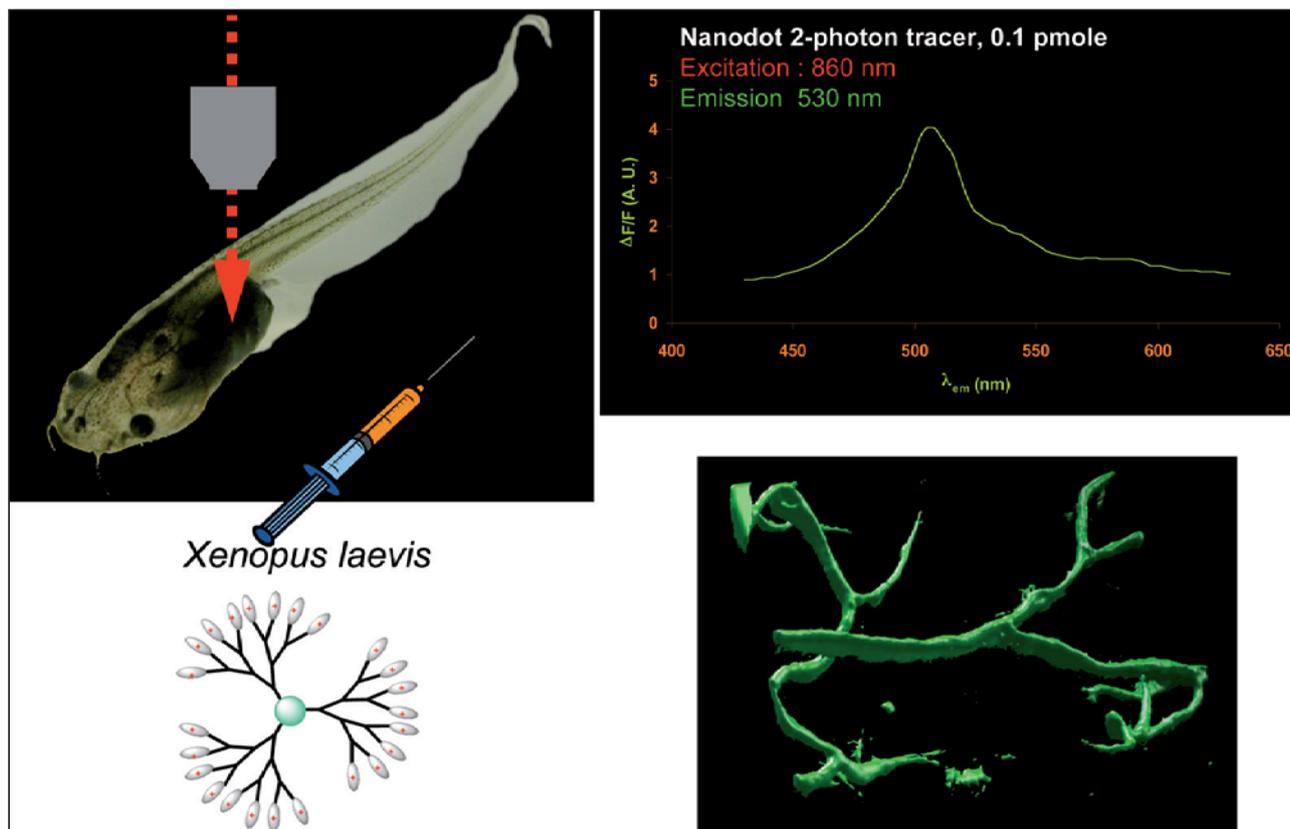
Figure 13

Exemple d'imagerie obtenue in vivo du petit animal par l'utilisation de nanodots organiques.

Des nanodots hydrosolubles émetteurs verts sont injectés en intracardiaque dans le têtard de *Xenopus* permettant ultérieurement la visualisation 3D du système vasculaire musculaire par imagerie multiphotonique. Collab. F. Tiaho, G. Recher (CNRS-Univ. Rennes 1).

Un autre intérêt majeur des dendrimères vient du contrôle de leur dimension : on peut conserver la taille et jouer sur la nature du fluorophore greffé pour modifier les propriétés du nano-objet fabriqué, alors que pour les quantum dots, chaque taille correspond à une propriété (couleur) particulière. Ces importants

progrès ont permis d'obtenir des images inédites. On a ainsi pu observer le cerveau d'un rat grâce à l'injection d'un nanodot émetteur bleu. Un autre exemple est celui de l'injection d'un nanodot émetteur vert ayant permis la visualisation du système vasculaire du têtard de *Xenopus* (Figure 13) après injection intracardiaque.



Conclusion

Ces travaux sur les techniques d'absorption à deux photons ouvrent de nouvelles perspectives, tant au niveau de l'imagerie biomédicale (diagnostic précoce, assistance à la chirurgie *peropératoire*) que de la thérapie, notamment anticancéreuse.

Bibliographie

- [1] a) Blanchard-Desce (2007), *Chem. Commun.*, 915-917 ; b) Blanchard-Desce (2007), *New J. Chem.*, **31** : 1354-1367.
- [2] Blanchard-Desce (2006), *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45** : 4645-4648.

Crédits photographiques

- Fig. 12 : Krishna T.R., Parent
M., Werts M.H.V., Moreaux
L., Gmouh S., Charpak, S.,

Caminade A.-M., Majoral
J.-P., Blanchard-Desce M.
(2006). *Angewandte Chemie*.