



CHRISTOPHE JOUVET*, MARIE-PIERRE FONTAINE**

*Centre laser, Laboratoire de photophysique moléculaire

**Centre de Photonique BioMédicale (CPBM)

Faculté des sciences d'Orsay

FAIRE LA LUMIÈRE SUR LA *matière*



© CNRS PHOTOTHÈQUE

Dans les années 60, naissaient les premiers lasers. Très vite, ces concentrés de lumière ont trouvé de multiples applications au service de la science ou au cœur de notre vie quotidienne ! C'est dire l'intérêt du tout nouveau CLUPS, comprenez Centre Laser de l'Université Paris-Sud, qui vient d'ouvrir ses portes sur le campus d'Orsay.

Utiliser les propriétés de la lumière pour visualiser, sonder et modeler la matière, du plus élémentaire atome jusqu'à la cellule vivante, tel est le but commun de nombreuses équipes de recherche. Il faut pour cela se doter d'outils performants : les lasers en sont un. Leur lumière est monochromatique, puissante, guidable et focalisable sur un échantillon. Les photons* issus d'un laser peuvent être regroupés temporellement pour n'éclairer la matière que pendant d'infimes fractions de secondes.

A chaque domaine de longueur d'ondes son laser : certains sont dupliqués à volonté autour de chaque expérience, dans chaque laboratoire, d'autres, de technologie plus complexe, ont vocation à être partagés. Le nouveau Centre Laser de l'Université Paris-Sud est composé de deux plateformes expérimentales : le serveur laser en physique-chimie qui mettra à la disposition d'une large communauté scientifique des lasers performants pour l'étude des processus physico-chimiques fondamentaux, en particulier sur des molécules biologiques et le centre de photonique biomédicale (CPBM) où physico-chimistes, opticiens, biologistes et médecins développeront ensemble des méthodes de diagnostic qui utilisent la lumière-laser.

Le serveur laser d'Orsay : des photons de toutes les couleurs

Cette plate-forme a vocation à accueillir des équipes de physiciens et de physico-chimistes de l'Université qui viendront y installer leurs expériences autour d'un ensemble de lasers - délivrant des pulses d'une dizaine de nanosecondes de durée - dont on pourra choisir la longueur d'onde depuis l'ultraviolet lointain jusqu'à l'infrarouge en passant par le domaine visible (**encadré 1**). Toutes ces possibilités sont très rarement réunies en un même lieu et leur combinaison permettra d'envisager les expériences les plus variées. Autant d'équipes de chercheurs, autant de systèmes étudiés, autant de combinaisons de lasers nécessaires ! Des dispositifs expérimentaux originaux, l'un possédant un spectromètre de masse de très haute résolution, l'autre une source d'espèces instables ou de molécules biologiques... vont se retrouver autour de ces photons communs. Ce mélange des cultures et des disciplines ne manquera pas d'engendrer des idées nouvelles, particulièrement dans les domaines aux interfaces (physico-chimie/astrophysique, physique/biologie, etc).

Sonder la matière

Chaque atome, chaque molécule, chaque espèce instable issue d'une réaction chimique, absorbe et émet la lumière d'une façon qui lui est propre et constitue sa véritable carte d'identité. La spectroscopie est l'étude de ces spectres lumineux. Le couplage de la

spectroscopie et du laser permet de mesurer cette signature avec une extrême précision. Cette qualité de la spectroscopie laser permet aux chercheurs d'identifier n'importe quelles molécules, où qu'elles soient, même à l'état de traces : dans l'atmosphère polluée de nos villes ou dans l'espace interstellaire, dans les cellules vivantes, dans un béccher où a lieu une réaction chimique... Connaître les spectres des molécules, en particulier lorsqu'elles sont isolées en phase gazeuse, c'est aussi acquérir des informations qui permettront d'en déduire leur géométrie dans l'espace et leurs propriétés pour comprendre leur comportement chimique. De plus, chaque domaine de longueur d'onde de la lumière fournit des informations différentes : les photons ultraviolets et visibles agissent sur les états électroniques des molécules, les photons infrarouges excitent les vibrations, etc. D'où l'utilité d'avoir tous ces outils à la fois pour étudier la matière sous tous ses aspects. Si certains composés n'ont presque plus de secrets pour les scientifiques, d'autres restent encore largement à explorer. Citons par exemple des espèces instables présentes dans les flammes, des constituants très minoritaires de l'atmosphère, des espèces intermédiaires produites lors de réactions chimiques et qui ne « vivent » qu'un instant, des ions, des molécules biologiques plus complexes... et bien d'autres sujets de recherche encore !

Provoquer des réactions

La photoréactivité est un autre grand domaine où les performances du Serveur Laser pourront ouvrir de nouvelles perspectives : grâce à la lumière des lasers, on peut provoquer des réactions à l'échelle moléculaire : les photons sont ici utilisés pour apporter de l'énergie au système réactif. Les domaines d'études vont bien au-delà de la physico-chimie proprement dite. Par exemple, on peut ainsi reproduire en laboratoire ce qui se passe dans le milieu interstellaire où les photons ultraviolets des étoiles induisent toute une chimie complexe aboutissant à la formation de molécules organiques. Ou encore étudier finement



© CLUPS

telle ou telle réaction entre un ion et une molécule qui participe à la chimie des ionosphères* planétaires. On peut encore utiliser la lumière des lasers, tel un ciseau à l'échelle moléculaire, pour fragmenter où l'on veut une molécule biologique complexe. Disposer de plusieurs lasers simultanément, c'est pouvoir agir sur toutes les étapes des processus, c'est aussi pouvoir « sonder », en enregistrant leurs spectres, des produits que l'on a fabriqués avec un premier laser.

L2 – où les plus récents développements des techniques optiques pourront être appliqués au domaine des Sciences de la Vie et de la santé. Des équipes de biophotonique et d'instrumentation biomédicale de l'UFR Orsay, de biologistes de l'UFR Orsay et de l'INRA ainsi que des médecins du C.H.U. de Paris-Sud (Kremlin-bicêtre, Paul Brousse et Gustave Roussy) vont y poursuivre leurs collaborations pour aboutir à l'élaboration d'instrumentations biomédicales originales, avec une orientation privilégiée vers le diagnostic précoce.

Le centre de photonique biomédicale (CPBM)

S'il est un domaine où l'optique gagne de plus en plus de terrain, c'est bien celui des Sciences du Vivant. Depuis les premiers microscopes développés au XVII^e siècle qui ont permis d'observer cellules sanguines et bactéries, l'imagerie médicale s'est considérablement développée et physiciens, physico-chimistes, biologistes et médecins collaborent désormais pour mettre au point des outils d'observation des milieux vivants. Le nouveau centre de photonique biomédicale de l'Université Paris-Sud est une plateforme – salles de prototypes expérimentaux, laboratoire de biologie de niveau de confinement

Utiliser la fluorescence...

Parmi les dispositifs de diagnostic émergents, les méthodes utilisant la fluorescence sont parmi les plus répandues. Les cellules ou les tissus vivants sont avant tout constitués de molécules et comme toute molécule, elles absorbent et émettent la lumière d'une façon qui leur est propre et qui permet de les identifier *in situ*. « L'excitation de la fluorescence » se déroule en deux temps : d'abord une molécule fluorescente (appelée fluorophore) absorbe la lumière – dans l'application que nous allons présenter, la source lumineuse est un laser dont la longueur d'onde est soigneusement choisie en fonction de la

1 Un ensemble de lasers

Le serveur laser dispose de trois lasers à colorants accordables, trois lasers de pompe Néodyme-Yag Q-switchés et injectés, un laser OPO infrarouge et un autre laser Néodyme-Yag non injecté de plus faible énergie. Ces lasers fournissent des impulsions d'environ 10ns à 10Hz (soit 10 impulsions par seconde).

Le YAG 1 (400 mJ de 532 nm et 400 mJ de 532 ou de 355 nm) sert au pompage de deux lasers à colorants (finesse 0,06 cm⁻¹) pour la génération du rayonnement VUV par mélange de fréquences dans un gaz rare. Le principe est le suivant, le premier laser à colorant fournit des photons UV, d'énergie $h\nu_1$, qui permettent l'excitation à deux photons d'un niveau électronique du gaz rare (Xénon ou Krypton), le deuxième laser à colorant fournit des photons d'énergie variable dans l'IR, le visible ou l'UV ($h\nu_2$) qui provoquent une transition vers un état virtuel qui émet un rayonnement VUV d'énergie $h\nu_{VUV} = 2 \cdot h\nu_1(\text{fixe}) + h\nu_2(\text{variable})$. Les différents faisceaux $h\nu_{VUV}$, $h\nu_1$ et $h\nu_2$ sont séparés par un réseau dans le monochromateur.

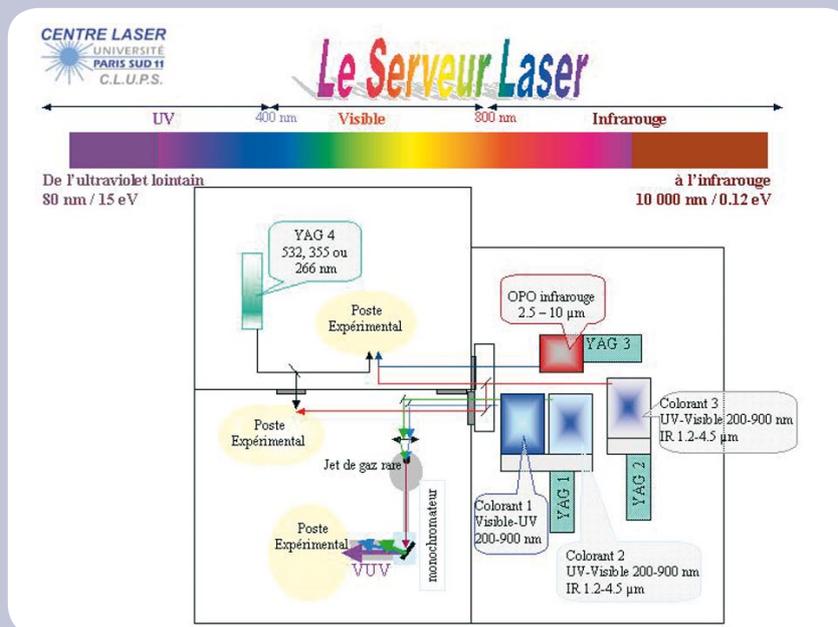
Le YAG 2 (800 mJ à 532 nm) pompe un laser à colorant qui couvrira la

gamme spectrale de 200 à 900 nm et de 1,3 à 4,5 μm .

Le YAG 3 sert de pompe à un laser OPO (oscillateur paramétrique optique) infra-rouge haute résolution qui fonctionne avec un cristal de KTP et donne des longueurs d'onde comprises entre 2,25 à 3,2 μm . Par mélange de fréquences avec l'harmonique fonda-

mental du YAG (1,064 μm) dans un cristal d'AgGaS₂ on étend le domaine accessible jusqu'à 10 μm .

Enfin le dernier YAG de plus faible énergie sera utilisé pour produire des espèces instables ou fragiles, des ions par évaporation laser ou par dissociation de précurseurs.



molécule à sonder – puis, dans un court laps de temps qui n'excède pas quelques dizaines de nanosecondes, le fluorophore émet un photon de fluorescence, que l'on peut recueillir sur un détecteur. A l'intérieur des cellules, il est de nombreuses molécules dont on peut « exciter » la fluorescence avec des lasers. On peut également introduire des colorants dans la cellule qui joueront ce rôle de fluorophores. L'idée générale est de détecter ces molécules en comparaison dans une cellule « normale » et une cellule pathologique (tumorale ou bien infectée) et de montrer qu'il existe des différences qui pourront donc être utilisées comme outil de diagnostic.

...pour réaliser des images *in situ*

Les cellules sont observées à travers l'objectif d'un microscope, mais au lieu d'éclairer la cellule avec de la lumière « blanche » et de regarder l'image transmise, on irradie point par point la cellule avec un faisceau laser, ce qui provoque la fluorescence de certains composants de la cellule : la lumière ainsi recueillie permet de réaliser une image. L'expérience acquise depuis 1998 sur un dispositif prototype IDEFIX - pour imagerie de la dynamique d'émission de fluorescence intracellulaire par excitation à X photons - a été mise à profit au CPBM avec la mise en place d'un microscope multimodal offrant encore davantage de possibilités (encadré 2). On peut reconstituer divers types d'images en exploitant l'ensemble des propriétés de la fluorescence : intensité de la lumière émise mais aussi spectre (longueurs d'onde émises), durée de vie de fluorescence (temps « moyen » au bout duquel les molécules émettent le photon de fluorescence)... Chacun de ces types d'image permet de déterminer où, quand, comment, pendant combien de temps, dans quel contexte, se produisent les processus intracellulaires permettant de différencier cellules normales et atypiques.

Premier exemple : mettre en lumière le cœur des cellules

L'imagerie de durée de vie de fluorescence est de plus en plus utilisée pour étudier les interactions spécifiques entre protéines en cellule vivante. Elle apporte des informations spatiales mais aussi dynamiques (évolution en fonction du temps), par exemple au cours de la réponse à une hormone ou lors d'un processus de phagocytose*. Les fluorophores utilisés sont des protéines naturellement fluorescentes (les Green Fluorescent Proteins), que l'on peut « accrocher » spécifiquement aux protéines étudiées afin de les suivre dans le milieu cellulaire. Sur ces systèmes, nous avons montré que l'analyse combinée des durées de vie, des spectres et des intensités de fluorescence permet non seulement de mettre en évidence des interactions, mais également de modéliser des équilibres d'association, ou d'analyser

FIGURE 1

Comparaison entre cellules normales et cellules cancéreuses

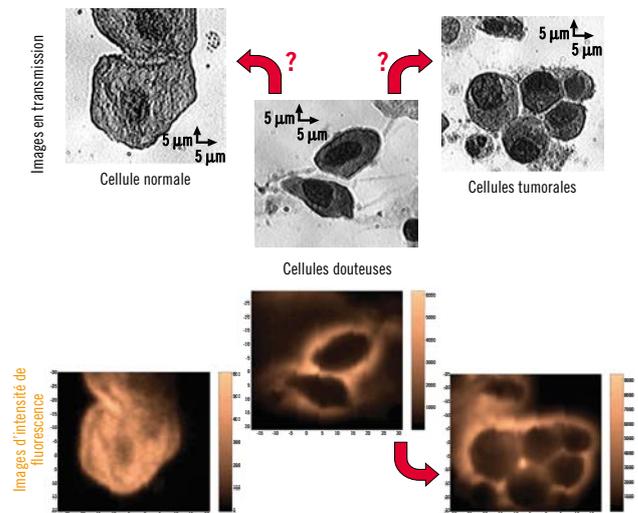
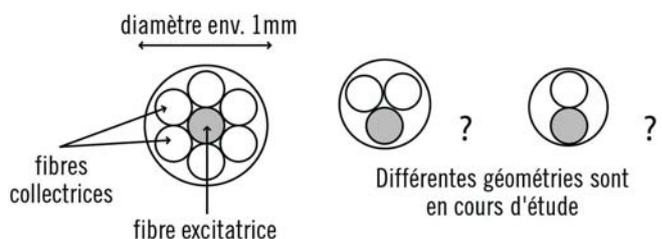
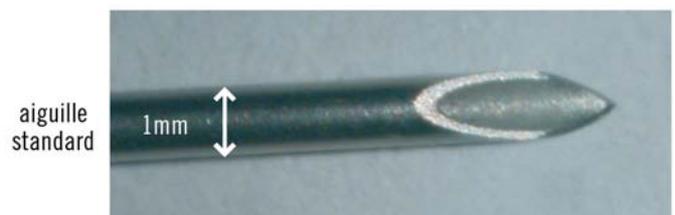
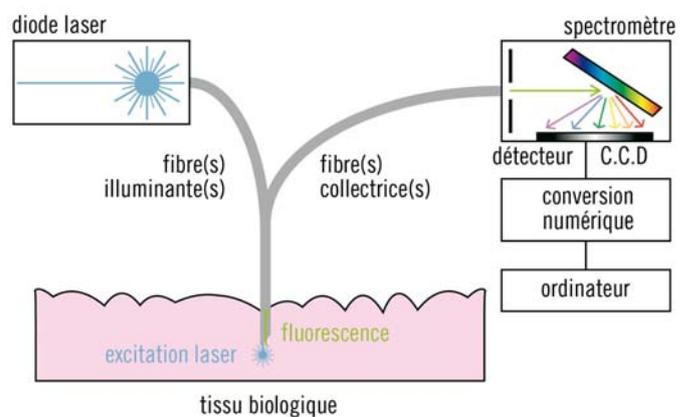


FIGURE 2

Dispositif expérimental schématisé et aiguille fibrée.



des phénomènes tels que l'encombrement moléculaire. Ces méthodes, qui ouvrent des possibilités très intéressantes d'étude *in situ* de l'organisation des biomolécules, seront développées sur le microscope multimodal du CPBM.

Deuxième exemple : aide au dépistage du cancer de la vessie

Plus un cancer est détecté précocement, plus le pronostic de guérison est élevé. Certaines populations à risque (les fumeurs notamment) nécessitent d'être surveillées de façon efficace mais peu contraignante. L'examen de routine pratiqué appelé cytologie urinaire, est l'étude morphologique en microscopie classique des cellules extraites des urines. Le diagnostic repose alors sur le regard expert de l'anatomopathologiste qui analyse entre autre la forme et le

regroupement des cellules (**figure 1**). Mais la fiabilité est limitée : certaines cellules atypiques, sont difficilement classables et dans 40 % des cas, un cancer débutant n'est pas diagnostiqué par cette méthode. L'imagerie de fluorescence a apporté une solution à ce problème : comme on le voit sur la figure, la fluorescence des cellules saines est localisée à l'intérieur de la cellule alors que celles des cellules tumorales est périmembranaire (à l'extérieur de la cellule). Un simple coup d'œil permet de classer les cellules douteuses. Cette technique a de plus le mérite de s'adapter parfaitement au protocole médical existant. Cela va donc faciliter son transfert vers le monde médical et sa possible adaptation à d'autres types de cytologies (col de l'utérus, sein...).

Pour cela, de nouvelles sources lasers vont être développées : plus compactes, moins coûteuses, en conservant la rapidité d'acquisition des images, et le grand domaine de longueur d'onde d'excitation de la fluorescence couvert par le microscope multimodal. C'est là tout un travail qui va être mené au CPBM (**encadré 3**).

2 Le microscope multimodal

Il est basé sur l'utilisation d'un microscope confocal* spectral commercial (SP5 Leica) qui offre de nombreuses possibilités d'évolution comme l'utilisation de sources laser pulsées associées à des systèmes d'imagerie de la dynamique d'émission de fluorescence (FLIM pour Fluorescence Lifetime Imaging et FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy). Le microscope multimodal du CPBM permet aussi d'avoir accès aux performances de la microscopie biphotonique au moyen d'une source laser Titane/Saphir femtoseconde (Cameleon, Coherent). Comme en microscopie confocale, les images de fluorescence des échantillons biologiques peuvent être obtenues par un balayage point par point du faisceau laser. Mais le microscope multimodal du CPBM bénéficie aussi de la mise au point d'une matrice de soixante-quatre faisceaux d'excitation biphotonique simultanés, un dispositif récemment développé par les laboratoires de Photophysique Moléculaire et Charles Fabry de l'Institut d'Optique, particulièrement bien adapté pour le balayage rapide de composés biologiques photosensibles.



Le microscope confocal

Troisième exemple : diagnostic précoce des infections survenant en réanimation

Les infections bactériennes survenant chez les patients hospitalisés en réanimation peuvent mettre en cause leur survie : la réponse du système immunitaire de l'organisme à l'infection par des bactéries pathogènes peut conduire à un sepsis*. Il est donc très important de pouvoir la pronostiquer précocement. Lorsqu'une bactérie est présente dans l'organisme, les globules blancs (lymphocytes, monocytes...) la reconnaissent au niveau membranaire. Un globule blanc stimulé par la présence de bactéries présente-t-il une fluorescence différente d'un globule blanc au repos ? Oui, c'est ce qui vient d'être montré avec des monocytes sanguins mis en présence de staphylocoques dorés. Les images obtenues avec le microscope à fluorescence montrent une localisation différente de la fluorescence dans les deux cas. Il s'agit maintenant de développer cette méthode et de la calibrer par rapport aux protocoles déjà existants pour surveiller les complications infectieuses survenant en réanimation. Ce type de méthode pourrait aussi présenter un intérêt dans l'étude des réactions immunitaires suite à des traumatismes graves, sans infection préalable.

Transposer ces méthodes *in vivo*

Pour diagnostiquer des lésions cancéreuses, on utilise aujourd'hui des techniques d'imagerie médicale (échographie, IRM, scanner ou mammographie...) qui permettent de mettre en évidence des zones anormales mais n'apportent pas toujours suffisam-

ment de renseignements quant au caractère tumoral de la lésion. Il faut alors pratiquer un prélèvement tissulaire – ou biopsie – qui sera analysé sous microscope. La biopsie est donc un acte invasif, traumatisant et contraignant pour le patient, et long et coûteux d'un point de vue médical. Au CPBM, les chercheurs se proposent de mettre au point une méthode de diagnostic basée sur la fluorescence de molécules naturellement présentes dans les tissus cancéreux. L'excitation de cette fluorescence par laser et ensuite sa collecte se feront au moyen de fibres optiques, insérées dans une aiguille de moins d'1 mm de diamètre (figure 2). L'aiguille sera introduite au cœur du tissu suspect par le praticien qui suivra sa progression dans l'organe par échographie. Plus de prélèvement à effectuer, un résultat immédiatement interprétable et « minimal invasif », voilà le but de ce développement expérimental.

La création du CLUPS va permettre à plusieurs cultures scientifiques de coexister et la réunion de ces compétences et ces savoir-faire expérimentaux vont favoriser le développement des idées et des dispositifs originaux et innovants pour l'étude des processus biologiques, de la molécule aux applications thérapeutiques.

De plus le CLUPS s'inscrit dans le cadre des pluriformations (PPF) mises en place à l'Université : les équipes qui le constituent souhaitent créer une animation scientifique et des ouvertures vers les diverses communautés intéressées (fédération LUMAT, Interface Physique-Biologie) et vers les formations (masters, écoles doctorales). ■

Glossaire

Ionosphère :

Dernière couche atmosphérique constituée d'un mélange de gaz et de plasma (les rayons UV du soleil -ou d'une étoile- sont suffisamment puissants pour arracher des électrons aux molécules présentes).

Microscope confocal :

Dispositif permettant d'obtenir des images de fluorescence en balayant un faisceau laser sur l'ensemble du plan focal d'un échantillon.

Phagocytose :

Mécanisme par lequel certaines cellules vivantes englobent et digèrent certaines particules étrangères.

Photon :

« Petit grain » (particule) de lumière. La lumière est une onde « électromagnétique » caractérisée par sa longueur d'onde mais on peut aussi considérer qu'elle renferme des petits grains d'énergie : les photons. L'énergie contenue dans un photon est directement relié à la longueur d'onde par la formule de Planck $E=hc/\lambda$ où λ est la longueur d'onde et c la vitesse de la lumière.

Sepsis :

Réaction excessive de l'organisme à une infection bactérienne conduisant à une inflammation généralisée, à la coagulation du sang pouvant provoquer la défaillance de certains organes et à terme le décès du patient.

3 Nouvelles sources laser pour microscopie plein champ

L'imagerie d'intensité de fluorescence, aussi performante soit elle, doit être corrélée à des expériences complémentaires de microscopie de fluorescence résolue en temps. Il est donc important de disposer de sources laser émettant des impulsions lumineuses aux mêmes longueurs d'onde que les lasers continus utilisés en microscopie d'intensité de fluorescence. Pour cela, nous mettons au point des sources laser impulsives compactes à base de cristaux dopés par des ions néodyme pompés par des diodes lasers de puissance. Ces sources délivrent des impulsions ultracourtes (de l'ordre de 10 ps) en utilisant la technique du verrouillage de modes passif par saturation de l'absorption d'un miroir élaboré à partir de matériaux semicon-

ducteurs. Le taux de répétition de ces lasers –typiquement de 1 à 10 MHz au lieu d'environ 100 MHz pour les lasers Ti-Saphir- peut être ajusté en développant des cavités de type multipassage. Ces lasers fonctionnant dans le proche infrarouge (entre 0,9 et 1,06 μm), il est nécessaire de développer des étages de conversion non linéaire pour d'une part convertir une partie du rayonnement de l'infrarouge à l'UV et d'autre part atteindre une accordabilité dans le visible (par exemple par effet Raman dans des fibres ou des cristaux) pour s'adapter aux bandes d'absorption des fluorophores couramment utilisés en microscopie de fluorescence biomédicale, qu'ils soient organiques (cyanines, GFP...) ou à base de nanoparticules semiconductrices. Ces nouvelles

sources pourront être utilisées pour faire de la microscopie plein champ, qui permet d'obtenir une image de fluorescence globale de l'échantillon, au détriment de la résolution spatiale qu'apporte la microscopie confocale et biphotonique (encadré 2). Pour remédier à cela, nous nous sommes engagés dans la mise au point d'un microscope sous illumination structurée.

Cette approche consiste à projeter sur le plan focal de l'échantillon un réseau qui va moduler la fluorescence venant principalement de ce plan, la modulation diminuant très rapidement en dehors du plan de focalisation. Cette technique permet d'assurer une résolution micronique aux techniques de microscopie de fluorescence plein champ.