

Horizons de chimistes en imagerie photonique

Résumé L'imagerie photonique de la matière vivante fournit un riche réservoir de besoins et d'opportunités pour la communauté des chimistes. Plutôt que de promouvoir une recherche spécifique, cet article propose un état des lieux et évoque les défis à relever dans un domaine en constant développement.

La matière vivante fascine les chimistes qui ont développé de puissants outils analytiques pour en interroger la singularité. Elle contient de nombreux constituants chimiques distincts (plus de 10^6) dont les concentrations couvrent une gamme extrêmement étendue (du millimolaire pour les ions abondants comme Na^+ , K^+ , ou Cl^- au picomolaire pour l'ADN). Elle présente de multiples échelles d'hétérogénéité spatiale et de dynamique temporelle et est dans un état hors équilibre. Interroger la matière vivante implique ainsi d'imager de multiples constituants en « temps réel » sans être invasif. Cet objectif est source de défis chimiques :

- **Marquage sélectif** : l'imagerie d'un constituant nécessite une signature spécifique. Mais dans une cellule, les constituants partagent essentiellement les mêmes compositions élémentaires et groupes fonctionnels, ce qui empêche le plus souvent de discriminer directement un constituant cible. Pour surmonter cette limitation, les chimistes développent de puissantes technologies pour introduire des marqueurs (par exemple des fluorophores) sur des biomolécules et les singulariser [1].

- **Sensibilité à ses limites** : la concentration minimale de marqueurs détectable en une durée donnée détermine la sensibilité d'une observable. En imagerie, l'état de l'art donne accès aux concentrations submicromolaires en 10 ms. Cette sensibilité demeure insuffisante pour imager en temps réel des acteurs cellulaires clés (facteurs de transcription, ARN messenger). Les chimistes explorent des stratégies d'amplification du signal s'appuyant sur des cascades de réactions [2] ou le marquage par des enzymes [3].

- **Élimination des interférences** : la matière vivante est hétérogène et diffuse la lumière [4]. Elle contient des constituants endogènes interférents (par exemple autofluorescents [5]). Ces caractéristiques sont préjudiciables pour extraire quantitativement et spatialement les signaux de marqueurs. Les chimistes développent des stratégies visant à surmonter ces interférences par la clarification des tissus [6] ou l'introduction de marqueurs chimiluminescents [7], bioluminescents [8], ou fluorescents dans l'infrarouge où l'autofluorescence est faible [9].

- **Observations multiplexées** : en imagerie, le signal d'un marqueur est couramment extrait dans le domaine spectral. Dans ce domaine, la sélectivité dépend du rapport entre largeur de bande du signal et étendue du domaine spectral de tous les signaux. En imagerie de fluorescence, qui bénéficie d'une excellente sensibilité, ce rapport est souvent supérieur à 0,25. Moins sensible, l'imagerie Raman atteint un rapport de 0,01, ce qui pourrait un jour permettre d'imager 10^2 marqueurs [10]. On reste bien loin de pouvoir imager plus de 10^6 constituants !

Devenue essentielle aux biologistes, l'imagerie de fluorescence en fournit une excellente illustration. Deux dimensions

– les longueurs d'onde d'excitation et d'émission – peuvent être exploitées pour cibler spectralement un marqueur spécifique. Cependant, la largeur à mi-hauteur des bandes d'absorption/émission des fluorophores couramment utilisés (50-100 nm) ne permet de distinguer au maximum que quatre marqueurs dans la gamme de longueurs d'onde UV-visible. Augmenter légèrement ce nombre nécessite une déconvolution, incertaine en précision et coûteuse en temps de calcul [11]. Or les stratégies émergentes de génie génétique [12] peuvent d'ores et déjà marquer un plus grand nombre de biomolécules ou de cellules. L'imagerie de fluorescence multiplexée est ainsi actuellement limitée non par le marquage mais par la discrimination des marqueurs. Comme leur optimisation spectrale – coefficient d'absorption molaire, rendement quantique de fluorescence, largeur des bandes d'absorption/émission – a essentiellement atteint ses limites physiques, discriminer davantage de marqueurs implique de compléter la dimension spectrale par une (ou plusieurs) autre(s) dimension(s).

Les chimistes ont inventé les titrages pour répondre à une telle demande. Un analyte n'y est pas sondé directement mais au travers de la thermodynamique et de la cinétique de sa réaction avec un réactif spécifique [13]. Le photocycle de réactions comprenant absorption de lumière et émission de fluorescence est analogue à une réaction de titrage. Il contient une riche information thermocinétique qui peut être utilisée pour mettre en œuvre un contraste dynamique et discriminer un marqueur au-delà de la seule longueur d'onde de son émission de fluorescence.

Des fluorophores spectralement similaires ont ainsi été discriminés grâce à leurs différences de durée de vie d'émission de fluorescence [14]. Cette première approche a cependant été limitée par la faible dispersion des durées de vie (quelques nanosecondes) des fluorophores brillants dont l'imagerie multiplexée a nécessité des déconvolutions.

Les fluorophores réversiblement photo-commutables ne souffrent pas de cet inconvénient. Leur photochimie dépasse le seul photocycle absorption-émission de fluorescence et engendre des temps de relaxation de photo-commutation de fluorescence à des échelles de temps plus variées qui restent compatibles avec les observations en temps réel des phénomènes biologiques. Plusieurs protocoles ont ainsi exploité la réponse temporelle de leur signal de fluorescence à des variations d'illumination pour les imager sans déconvolution [15]. Néanmoins, ils n'ont permis jusqu'à présent que de discriminer quatre marqueurs spectralement similaires [15d], un nombre encore loin de répondre à la demande de la biologie quantitative d'imager simultanément des dizaines de constituants dans une cellule ou de cellules voisines dans un tissu [16]. Contrairement à la discrimination spectrale qui a bénéficié d'un siècle de développements et atteint ses limites

physiques, le contraste dynamique dispose toutefois de marges d'amélioration considérables énumérées ci-après :

- **Nouveaux marqueurs** : les marqueurs actuellement disponibles n'ont pas été spécifiquement conçus et optimisés pour le contraste dynamique dont les figures de mérite reposent sur la cinétique des réactions et non sur les propriétés spectrales. En imagerie photonique, cette situation incite à concevoir des marqueurs dont les sections efficaces d'absorption, les durées de vie de luminescence, et les diverses constantes cinétiques des réactions impliquées dans leurs photocycles (croisement inter-système, échange de proton, oxydo-réduction, isomérisation...) soient diverses et optimisées. Dans cette perspective, le répertoire du chimiste s'élargit continuellement à de nouveaux complexes [17], molécules organiques [18] et clusters métalliques [19].

- **Nouveaux protocoles** : le développement du contraste dynamique ne se limite pas à synthétiser de nouveaux marqueurs et à les intégrer à la matière vivante. Les chimistes doivent également engager des efforts théoriques et instrumentaux pour introduire de nouveaux protocoles d'imagerie exploitant de façon optimale les caractéristiques cinétiques des marqueurs. Il s'agit par exemple de calculer l'évolution temporelle des concentrations et des signaux de réactifs et produits impliqués dans des mécanismes complexes ; de proposer des traitements de données pour extraire l'information cinétique recherchée ; de concevoir et construire des instruments optiques fournissant éclaircissements et acquisitions du signal à façon.

- **Nouvelles observables** : des marqueurs fournissant de nouvelles observables doivent aussi être conçus. Une observable (par exemple l'intensité du signal de fluorescence) rend compte classiquement de la concentration instantanée d'un marqueur. Il faut donc enregistrer un film pour reconstruire l'évolution temporelle du système. Pour obtenir des images tridimensionnelles à haute résolution spatiale, cette approche nécessite d'acquérir, traiter et stocker d'énormes quantités de données, ce qui devient aujourd'hui limitant en bio-imagerie. Un développement prometteur consisterait ainsi à concevoir des marqueurs intégrateurs qui rendraient compte non pas d'un état mais d'une succession d'états, fournissant l'information d'un film dans un format compact. Il est ainsi récemment devenu possible d'identifier *a posteriori* des neurones qui avaient été parcourus par un influx nerveux en conditionnant leur marquage fluorescent par l'internalisation d'ions calcium [20].

- **Nouvelles pratiques** : l'imagerie de la matière vivante demande enfin d'intégrer développements théoriques et instrumentaux, systèmes et marqueurs, dans le cadre de questions scientifiques issues de communautés éloignées. Au-delà des considérations précédentes qui leur montrent qu'il y a beaucoup à faire, les chimistes sont donc encouragés à sortir de leur laboratoire et de leur communauté. Nul doute qu'ils trouveront du plaisir à explorer le domaine de l'imagerie de la matière vivante grâce aux riches interactions avec les scientifiques d'autres horizons (physiciens, biologistes, spécialistes des données, etc.).

[1] K.M. Marks, G.P. Nolan, Chemical labeling strategies for cell biology, *Nat. Methods*, **2006**, *3*, p. 591-596 ; K.M. Dean, A.E. Palmer, Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging, *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*, p. 512-523 ; E.A. Specht, E. Braselmann, A.E. Palmer, A critical and comparative review of fluorescent tools for live-cells imaging, *Annu. Rev.*, **2017**, *79*, p. 93-117.

[2] X. Sun, D. Shabat, S. T. Phillips and E. V. Anslyn, Self-propagating amplification reactions for molecular detection and signal amplification: advantages, pitfalls, and challenges, *J. Phys. Org. Chem.*, **2018**, *31*, p. e3827-35.

[3] A.P. Demchenko, *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Science & Business Media, **2008**.

[4] S.L. Jacques, Optical properties of biological tissues: a review, *Phys. Med. Biol.*, **2013**, *58*, p. R37-R61.

[5] A.C. Croce, G. Bottiroli, Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis, *Eur. J. Histochem.*, **2014**, *58*, p. 320-337.

[6] D.S. Richardson, J.W. Lichtman, Clarifying tissue clearing, *Cell*, **2015**, *162*, p. 246-257.

[7] N. Hananya, D. Shabat, Recent advances and challenges in luminescent imaging: bright outlook for chemiluminescence of dioxetanes in water, *ACS Cent. Sci.*, **2019**, *5*, p. 949-959 ; Q. Li, J. Zeng, Q. Miao, M. Gao, Self-illuminating agents for deep-tissue optical imaging, *Front. Bioeng. Biotech.*, **2019**, *7*, 326.

[8] A. Fleiss, K.S. Sarkisyan, A brief review of bioluminescent systems, *Curr. Genet.*, **2019**, *65*, p. 877-882.

[9] G. Hong, A.L. Antaris, H. Dai, Near-infrared fluorophores for biomedical imaging, *Nat. Biomed. Eng.*, **2017**, *1*, 0010.

[10] L. Wei, W. Min *et al.*, Super-multiplex vibrational imaging, *Nature*, **2017**, *544*, p. 465-470.

[11] F. Cutrale, S.E. Fraser *et al.*, Hyperspectral phasor analysis enables multiplexed 5D *in vivo* imaging, *Nat. Methods*, **2017**, *14*, p. 149-152 ; A. Valm, J. Lippincott-Schwartz *et al.*, Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome, *Nature*, **2017**, *546*, p. 162-167.

[12] J. Livet, J.W. Lichtman *et al.*, Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system, *Nature*, **2007**, *450*, p. 56-62 ; M. Mansouri, I. Berger, P. Berger *et al.*, Highly efficient baculovirus-mediated multigene delivery in primary cells, *Nat. Commun.*, **2016**, *7*, 11529 ; Y. Cai, J. Ellenberg *et al.*, Experimental and computational framework for a dynamic protein atlas of human cell division, *Nature*, **2018**, *561*, p. 411-415.

[13] R. Winkler-Oswatitsch, M. Eigen, The art of titration. From classical end points to modern differential and dynamic analysis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1979**, *18*, p. 20-49.

[14] J.R. Lakowicz, H. Szmajdzinski, K. Nowaczyk, K.W. Berndt, M.L. Johnson, Fluorescence lifetime imaging, *J. Fluoresc.*, **1992**, *202*, p. 316-330 ; b) P.I. Bastiaens, A. Squire, Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell, *Trends Cell Biol.*, **1999**, *9*, p. 48-52.

[15] a) G. Marriott *et al.*, Optical lock-in detection imaging microscopy for contrast-enhanced imaging in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, p. 17789-794 ; b) J.-C. Hsiang, A.E. Jablonski, R.M. Dickson, Optically modulated fluorescence bioimaging: visualizing obscured fluorophores in high background, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, p. 1545-554 ; c) J. Widengren, Fluorescence-based transient state monitoring for biomolecular spectroscopy and imaging, *J. R. Soc., Interface*, **2010**, *7*, p. 1135-144 ; d) J. Quérard, T. Le Saux, L. Jullien *et al.*, Resonant out-of-phase fluorescence microscopy and remote imaging overcome spectral limitations, *Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 969 ; e) R. Chouket, T. Le Saux, L. Jullien *et al.*, Dynamic contrast with reversibly photoswitchable fluorescent labels for imaging living cells, *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, p. 2882-887.

[16] R. Weissleder, M. Nahrendorf, Advancing biomedical imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*, p. 14424-428 ; H. Grecco, S. Imitiaz, E. Zamir, Multiplexed imaging of intracellular protein networks, *Cytometry, Part A*, **2016**, p. 761-775.

[17] D. Jin, J.A. Piper, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, p. 2294-2300, <https://doi.org/10.1021/ac103207r>.

[18] R.M. Rich, I. Gryczynski, R. Fudala *et al.*, Elimination of autofluorescence in fluorescence correlation spectroscopy using the AzaDiOxaTriAngulenium (ADOTA) fluorophore in combination with time-correlated single-photon counting (TCSPC), *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405*, p. 4887-894.

[19] B.C. Fleischer, J.T. Petty, J.C. Hsiang, R.M. Dickson, Optically activated delayed fluorescence, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2017**, *8*, p. 3536-543.

[20] B.F. Fosseque *et al.*, Neural circuits. Labeling of active neural circuits *in vivo* with designed calcium integrators, *Science*, **2015**, *347*, p. 755-760.

Béatrice ADELIZZI^a, Raja CHOUKET^a, Lucie LUDVIKOVA^a
et **Agnès PELLISSIER-TANON^a**, postdoctorants, **Agathe ESPAGNE^a**, chargée de recherche, **Ludovic JULLIEN^a**, professeur, **Aliénor LAHLOU^{ab}**, doctorante, **Annie LEMARCHAND^c**, directrice de recherche, et **Thomas LE SAUX^a**, maître de conférences.

^aLaboratoire PASTEUR, Département de Chimie, École Normale Supérieure, Université PSL, Sorbonne Université, CNRS, Paris.

^bSony Computer Science Laboratories, Paris.

^cSorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée (LPTMC), Paris.

* Ludovic.Jullien@ens.psl.eu