

# La photonique pour l'étude du milieu biologique

## De la réactivité au diagnostic

Sandrine Lévêque-Fort, Karine Steenkeste, Pascaline Lacroix, Francis Tfibel et Marie-Pierre Fontaine-Aupart

### Abstract **Photonics for the study of biological systems: from the reactivity to the diagnostic**

Fluorescence microscopy under two photon excitation is a recent biophotonic development aiming at original fluorescence analysis by intensity and fluorescence lifetime imaging. After a brief description of the performance of the instrumental set up, its utilization for studies of pharmacological and biomedical interest is presented.

### Mots-clés **Biophotonique, microscopie biphotonique, FLIM, anti-VIH-1, biofilms, cancers de vessie.**

### Key-words **Biophotonic, two-photon microscopy, FLIM, anti-HIV-1, biofilms, bladder cancers.**

L'optique/photonique appliquée aux milieux vivants (biophotonique) est une discipline en forte émergence qui vise à élaborer et intégrer des technologies optiques innovantes pour des domaines aussi variés que la recherche fondamentale en biologie et biotechnologie, le biomédical (diagnostic, étude des tissus et thérapie clinique), la pharmacologie (photochimiothérapie) ou encore l'environnement (substances infectieuses en milieu médical). En tirant parti d'une part des propriétés des photons (confinement spatial, temporel, couverture spectrale), et d'autre part des propriétés optiques des systèmes biologiques (absorption, autofluorescence, diffusion, réfraction, anisotropie), différentes techniques d'imagerie non invasives des milieux vivants par voie optique ont émergé ces dernières années. Parmi les plus innovantes, on peut distinguer celles qui utilisent de nouvelles méthodes de détection des signaux optiques (méthodes de cohérence optique (OCT) et acousto-optique [1-2], imagerie spectrale en mode fluorescence ou Raman [3-4]) et celles qui exploitent les nouvelles sources laser femtoseconde pour le développement de l'optique non linéaire (génération d'harmoniques [5], microscopie biphotonique [6]).

Cependant, si l'on compare le développement des dispositifs biophotoniques, on peut constater que les méthodes utilisant la fluorescence sont les plus largement répandues. Elles constituent en effet de puissants outils dans la mesure où elles permettent d'une part de faire le lien entre le comportement *in vitro* et *in vivo* des biopolymères, et d'autre part sont tout à fait adaptées aussi bien à l'étude de la cellule qu'à l'outil thérapeutique. C'est en particulier la spécificité de la microspectroscopie de fluorescence qui a la capacité de détecter, quantifier et fournir des images aussi bien des composants naturels des systèmes biologiques (acides aminés, collagène, NAD(P)H, flavines oxydées, porphyrines, etc.) que des sondes extrinsèques (médicaments, photosensibilisateurs, marqueurs d'ions...). Le développement et l'application de ces techniques à l'étude des biomolécules, cellules et tissus exigent une parfaite compréhension de l'interaction rayonnement

(photons)-matière (systèmes biologiques), compréhension acquise au moyen d'études photophysiques et photochimiques. Il s'agit donc d'un domaine de recherche pluridisciplinaire fondé sur des collaborations entre physiciens, chimistes, biologistes et cliniciens.

C'est grâce à une synergie de compétences que le laboratoire a pu développer, en association avec le Laboratoire Charles Fabry (Institut d'Optique de l'Université Paris Sud Orsay) et le Laboratoire de chimie-physique (Université Paris Sud Orsay), un dispositif prototype original d'imagerie de la dynamique d'émission de fluorescence intracellulaire par

### Glossaire

#### **Autofluorescence**

Fluorescence provenant des fluorophores endogènes au milieu cellulaire et tissulaire (acides aminés aromatiques des protéines, NAD(P)H, flavoprotéines, collagène, élastine, porphyrines, etc.).

#### **Cellules HeLa**

Fibroblastes servant de modèles, isolés à partir d'un cancer de l'utérus.

#### **Comptage de photons**

Méthode de détermination de durée de vie de fluorescence basée sur la détection de photons de fluorescence uniques (statistiquement, moins d'un photon est émis pour chaque impulsion laser excitatrice).

#### **Cytologie**

Étude de la cellule.

#### **Cytoscopie**

Acte de diagnostic au moyen d'un endoscope (source de lumière blanche).

#### **Déclin de fluorescence**

Décroissance temporelle (mono ou multi-exponentielle) de l'intensité de fluorescence.

#### **Histologie**

Étude du tissu normal.

#### **Lésion papillaire**

Structure d'une lésion en forme de papille.

#### **Photonique**

Génération, manipulation, transmission et détection de photons.

excitation à deux photons (système IDEFIX). Cette instrumentation s'appuie sur les développements récents en biophotonique que sont la microscopie par excitation à deux photons (*encadré 1*), l'analyse de la dynamique d'émission de fluorescence par imagerie des durées de vie de fluores-

cence (FLIM pour « fluorescence lifetime imaging ») (*encadré 2*) et la microscopie de corrélation de fluorescence (FCS pour « fluorescence correlation spectroscopy »). Le principe de la FCS et les exemples d'applications biomédicales que nous avons développés peuvent être consultés

### Encadré 1

#### L'excitation biphotonique (TPE pour « two photon excitation »)

La microscopie par excitation à deux photons représente l'une des avancées les plus significatives en microscopie optique depuis l'introduction de la microscopie confocale à balayage laser [7]. Le caractère non linéaire du processus d'absorption à deux photons localise strictement l'excitation de la fluorescence ainsi que les photodommages (voir schémas A et B), au point de plus grande focalisation du faisceau (~ 1  $\mu\text{m}^3$ ), ce qui présente toute une série d'avantages très attractifs pour l'imagerie cellulaire et tissulaire dont les plus importants dans le cadre de notre recherche sont (i) une minimisation de la photo-destruction des échantillons biologiques pendant la collection des images permettant des observations prolongées, (ii) une amélioration de la profondeur de pénétration dans des échantillons épais du fait de l'utilisation de sources laser proche infrarouge (laser titane/saphir accordable dans le domaine spectral 650-900 nm), (iii) une parfaite séparation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission permettant ainsi de s'affranchir du « bruit » issu de la lumière diffusée par l'échantillon, proche de la longueur d'onde d'excitation.

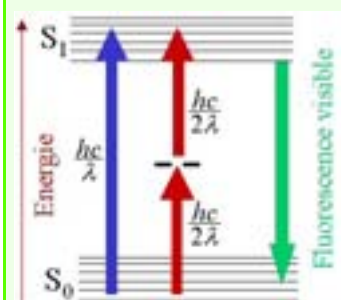


Schéma A - Principe de l'absorption et de l'émission de fluorescence sous excitation à un (bleu) et deux (rouge) photons.

Dans le cas d'une absorption à deux photons, on montre que le flux de photons de fluorescence émis est proportionnel à  $\delta C F^2$  où  $\delta$  est la section efficace d'absorption biphotonique (en  $\text{cm}^4 \cdot \text{s} / \text{molécule} \cdot \text{photon}$ ), C la concentration du fluorophore et F le flux de photons incident. Étant données les très faibles probabilités de transition à deux photons, le flux de photons incident doit être très élevé afin d'obtenir une bonne efficacité d'excitation de la fluorescence.

On démontre qu'il dépend de E, l'énergie par impulsion,  $\Delta\tau$ , la durée des impulsions et  $\omega$ , la section du faisceau laser. Cette expression montre clairement que le flux de photons incident sera d'autant plus élevé que la largeur des impulsions et la section du faisceau laser seront faibles. Ainsi, pour les expériences d'absorption à deux photons, on utilise typiquement des lasers à saphir dopés au titane délivrant des impulsions infrarouges d'une durée ~ 100 femtosecondes. Par ailleurs, lorsqu'un faisceau laser est focalisé au foyer d'un objectif, la taille minimale de la section de focalisation  $\omega$  dépend de l'ouverture numérique de l'objectif (ON) selon l'expression  $\omega \propto 1/\text{ON}$ . Pour concentrer l'énergie spatialement et obtenir une section de focalisation la plus petite possible, on utilise donc des objectifs de grande ouverture numérique.

$$F \propto \frac{E}{h\nu} \frac{1}{\Delta\tau\omega^2}$$

On démontre qu'il dépend de E, l'énergie par impulsion,  $\Delta\tau$ , la durée des impulsions et  $\omega$ , la section du faisceau laser. Cette expression montre clairement que le flux de photons incident sera d'autant plus élevé que la largeur des impulsions et la section du faisceau laser seront faibles. Ainsi, pour les expériences d'absorption à deux photons, on utilise typiquement des lasers à saphir dopés au titane délivrant des impulsions infrarouges d'une durée ~ 100 femtosecondes. Par ailleurs, lorsqu'un faisceau laser est focalisé au foyer d'un objectif, la taille minimale de la section de focalisation  $\omega$  dépend de l'ouverture numérique de l'objectif (ON) selon l'expression  $\omega \propto 1/\text{ON}$ .

Pour concentrer l'énergie spatialement et obtenir une section de focalisation la plus petite possible, on utilise donc des objectifs de grande ouverture numérique.

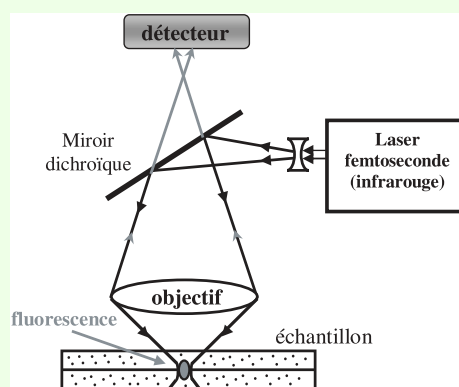


Schéma B - Principe d'un microscope par excitation à deux photons.

### Encadré 2

#### L'imagerie de durées de vie de fluorescence (FLIM)

En plus des mesures stationnaires d'intensité de l'émission de fluorescence, le signal de fluorescence peut aussi être analysé par une discrimination temporelle. En effet, la détermination de la cinétique d'émission d'un fluorophore est une caractéristique de l'émetteur donnant accès non seulement à sa durée de vie moyenne mais aussi le cas échéant à ses durées de vie multiples. Ce paramètre caractérise quantitativement ses propriétés intrinsèques et les effets de son environnement immédiat (variation de pH, de polarité, de concentration en oxygène...). Il échappe à de nombreux artefacts qui affectent la quantification des intensités stationnaires en microscopie de fluorescence : photoblanchiment, variations de concentrations locales, mouvements cellulaires, variation dans l'efficacité de l'excitation ou de détection. En utilisant la durée de vie de fluorescence comme facteur de contraste fonctionnel, la fluorescence résolue en temps est une méthode qui allie une très haute sensibilité avec des conditions de mesure non destructives. Combinée à des techniques de microscopie et d'imagerie de milieux cellulaires, l'imagerie de fluorescence résolue en temps (FLIM) permet, en complément des

informations de localisation et de topologie apportées par la microscopie conventionnelle, une analyse dynamique de processus moléculaires et métaboliques au sein des cellules. Différentes méthodes d'analyse numérique de la distribution des durées de vie en chaque point d'une image sont disponibles. Si l'on souhaite obtenir une image FLIM **en temps réel**, on utilisera une méthode MLE (« maximum a posteriori lifetime estimator ») [19] qui donne accès à une durée de vie moyenne sans tenir compte de la réponse instrumentale. C'est une méthode suffisante si l'on désire uniquement visualiser des modifications de durées de vie sans chercher à les déterminer précisément. Au contraire, si l'on recherche la quantification des différentes composantes que peut contenir un déclin de fluorescence, en particulier celles à très courtes durées de vie, il est alors nécessaire d'utiliser un traitement numérique du signal plus performant comme une méthode d'analyse globale [20] ou de détermination du maximum d'entropie [21]. Un tel traitement est certes plus performant mais plus coûteux en temps et ne peut être appliqué que pour quelques points spécifiques d'une image.

dans la littérature [7-8]. Nous nous limiterons dans le présent article à la présentation de travaux récents réalisés par imagerie d'intensité et de durée de vie de fluorescence sous excitation à deux photons sur (i) l'étude du ciblage cellulaire de nouveaux inhibiteurs du VIH et (ii) les premiers pas vers la mise au point d'un diagnostic précoce de cancers, des études développées au Laboratoire de photophysique moléculaire en collaboration avec d'autres structures de recherche fondamentale et hospitalières.

## L'instrumentation IDEFIX

L'instrumentation IDEFIX, basée sur l'utilisation d'une source laser titane/saphir femtoseconde, offre l'accès à différentes voies d'excitation et plusieurs modes de détection de l'émission de fluorescence. En effet, la puissance disponible de chaque impulsion en sortie de cavité (~ 700 mW) est utilisée pour servir deux voies d'excitation simultanées. La première, à ~ 100 mW, permet une excitation biphotonique monopoint des échantillons : les images de fluorescence sont obtenues en balayant le point de mesure submicronique sur l'ensemble du plan focal par déplacement du faisceau laser au moyen de miroirs galvanométriques (balayage laser) (figure 1a). La seconde voie d'excitation (~ 600 mW) constitue un dispositif original de microscopie multifocale (MIM) [9], récemment développé par le laboratoire en collaboration avec l'équipe de Patrick Georges du

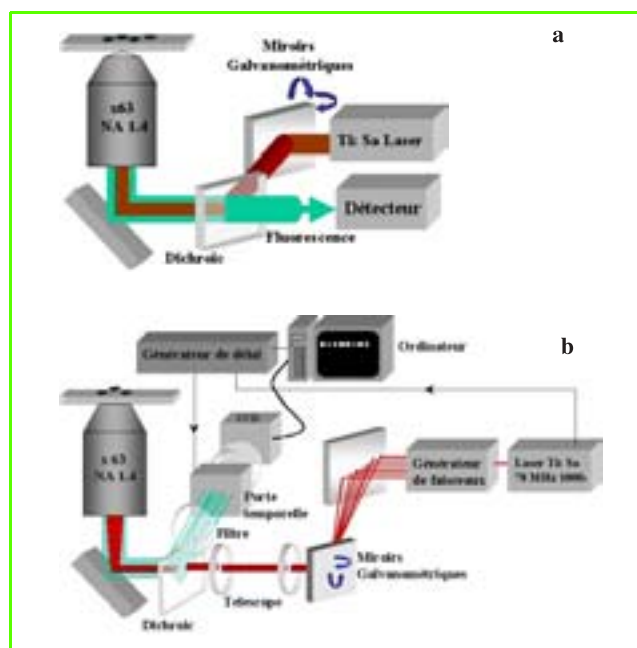


Figure 1 - Représentation schématique du montage de microscopie de fluorescence IDEFIX.

La source laser femtoseconde (modèle MIRA 900-F, Coherent) est accordable en longueur d'onde de 690 à 1 000 nm. Le microscope est un modèle fonctionnant en mode inverse (modèle Axiovert 135, Carl Zeiss). (a) Voie d'excitation monopoint : le système de détection est interchangeable selon que l'on effectue des mesures d'intensité de fluorescence ou des mesures de FLIM. Dans tous les cas, le signal de fluorescence est détecté par un photomultiplicateur rapide (picoseconde) fonctionnant en régime de comptage de photons et relié à un amplificateur/sélecteur d'impulsions (EG & G Ortec). L'acquisition d'images d'intensité de fluorescence est obtenue au moyen d'une carte de comptage de photons (National Instrument). Pour les données FLIM, le signal amplifié est dirigé sur un analyseur en temps picoseconde (Picosecond Time Analyzer, EG & G Ortec). (b) Voie d'excitation multipoints et détection de la fluorescence par intensité et FLIM. Le système de détection se compose d'une caméra CCD 12 bits (Hamamatsu) devant laquelle est placée une porte temporelle picoseconde à haute cadence (200 ps à 80 MHz, Kentech Instruments).

Laboratoire Charles Fabry, permettant de générer une ligne de 8 faisceaux d'excitation biphotonique. L'ensemble de ces points disposés typiquement à 4  $\mu\text{m}$  l'un de l'autre peut être balayé sur l'ensemble du plan focal de l'échantillon au moyen du même système de balayage laser que celui utilisé pour l'excitation monopoint (figure 1b).

Sur chacune des voies, l'analyse de la fluorescence émise par les constituants cellulaires ou par des chromophores piégés dans une matrice (cellule, tissus, biofilm) peut être réalisée par les modes complémentaires d'imagerie d'intensité et de déclin de fluorescence (encadré 2). Ce sont à la fois la durée du balayage de l'excitation laser et le système d'acquisition des photons de fluorescence qui conditionnent le rythme d'acquisition des images.

Sur la voie d'excitation monopoint, les déclin de fluorescence sont obtenus par la méthode de comptage de photon unique corrélé en temps (TCSPC pour « time correlated single photon counting »), méthode la plus performante en terme de sensibilité et résolution temporelle (quelques picosecondes) [10]. L'étude de la fluorescence des inhibiteurs du VIH mettra en évidence la nécessité de disposer d'une telle résolution temporelle. Cependant, cette précision est atteinte au détriment de la rapidité d'acquisition qui est typiquement ~ 30 s par point (pour des mesures de FLIM), un temps trop long pour l'étude de certains systèmes biologiques. Dans le cas de l'excitation multipoints, l'acquisition des images des déclin est réalisée par échantillonnage temporel du déclin [11]. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une caméra CCD très sensible, devant laquelle est placée une porte temporelle qui donne accès à l'obtention d'images d'intensité et de durée de vie de fluorescence se rapprochant de la cadence vidéo (30 images/seconde). La résolution de la méthode est alors limitée par la largeur des portes temporelles utilisées lors de l'acquisition des déclin de fluorescence (20 ps pour notre système). Ce système sera particulièrement bien adapté pour le balayage rapide de milieux biologiques photosensibles ou encore pour l'examen rapide de lames cytologiques comme décrit ci-après.

## Imagerie de la dynamique d'émission de fluorescence (FLIM) pour l'étude du ciblage cellulaire d'inhibiteurs du VIH-1

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), décrit pour la première fois au début des années 80, est dû à l'infection par un virus appelé virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le développement de la pandémie de SIDA et l'apparition de résistances aux médicaments utilisés à l'heure actuelle justifient la recherche active autour du développement de nouveaux inhibiteurs de la réplication du virus. L'article de J.-F. Mouscadet (Laboratoire de l'ENS Cachan) dans ce même numéro fait état des récents développements de la pharmacologie anti-VIH.

L'intégrase est, avec la transcriptase inverse et la protéase, la troisième enzyme virale dont dépend la réplication du VIH. Elle catalyse l'insertion covalente ou intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules infectées. Mais contrairement à la transcriptase inverse et à la protéase pour lesquelles plusieurs classes d'inhibiteurs ont été développées, aucun inhibiteur d'intégrase n'est actuellement utilisé en traitement clinique. Les progrès récents de la biologie structurale de l'enzyme ont néanmoins permis d'identifier plusieurs séries d'inhibiteurs de son activité. Parmi ceux-ci, les

2 styrylquinolines substituées [12], synthétisées par l'équipe du Pr Jean d'Angelo (Laboratoire de chimie organique du Centre d'études pharmaceutiques du site de Châtenay-Malabry, Université Paris Sud), dont le composé le plus prometteur, objet de notre étude, est représenté sur la *figure 2*. Cependant, ces molécules présentent une activité inhibitrice insuffisante *in vitro* et *in vivo* ; la recherche active dans ce domaine a pour objectif d'améliorer leur index thérapeutique. A dessein, il était nécessaire d'identifier le ciblage cellulaire de ce type d'inhibiteurs et de déterminer leur profil d'action. Par ailleurs, l'amélioration de leur efficacité thérapeutique nécessite de découpler activité spécifique et non spécifique et donc d'identifier les déterminants moléculaires de la non-spécificité de ces antiviraux potentiels. C'est l'objectif de notre recherche développée en étroite collaboration avec l'équipe de J.-F. Mouscadet.

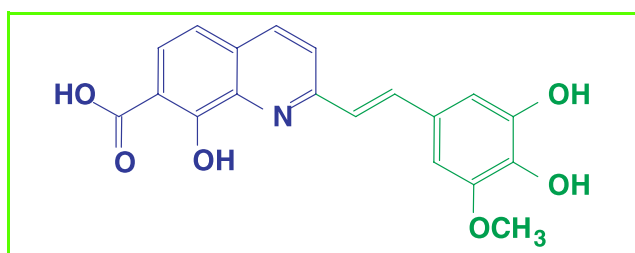


Figure 2 - Structure moléculaire de l'inhibiteur d'intégrase de type 2-styrylquinoline substituée utilisé dans le cadre de ce travail.

Il se compose d'une partie quinoline possédant une fonction salicylique et d'une partie styryle substituée par deux fonctions alcool en position ortho (également appelée catéchol) et une fonction méthoxy.

Pour mener à bien cette étude, nous avons étudié dans un premier temps les propriétés (photo)physico-chimiques de ces composés de type *trans*-2 styrylquinoline en solution. En effet, ces molécules sont susceptibles d'adopter différentes géométries (appelées formes tautomères ou rotamères) en raison d'une possible rotation des parties styryle et quinoline autour de la simple liaison les reliant entre elles (*figure 2*). Les propriétés physico-chimiques des *trans*-2 styrylquinolines correspondent aux contributions de chacune de ces différentes conformations. Il était ainsi fondamental de connaître la structure moléculaire prédominante de notre anti-intégrase dans différentes conditions d'environnement, en particulier en milieu cellulaire. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'inhibiteur sont représentés sur la *figure 3*. Leur évolution dans diverses conditions d'environnement (pH, force ionique, polarité du solvant) ainsi que l'analyse dynamique de l'émission de fluorescence de la molécule ont permis de montrer qu'au pH physiologique, il existait effectivement un équilibre entre deux types de rotamères présentant chacun une signature spectroscopique spécifique [13]. Ce résultat est illustré sur la *figure 3* où l'on observe que le déclin d'émission de

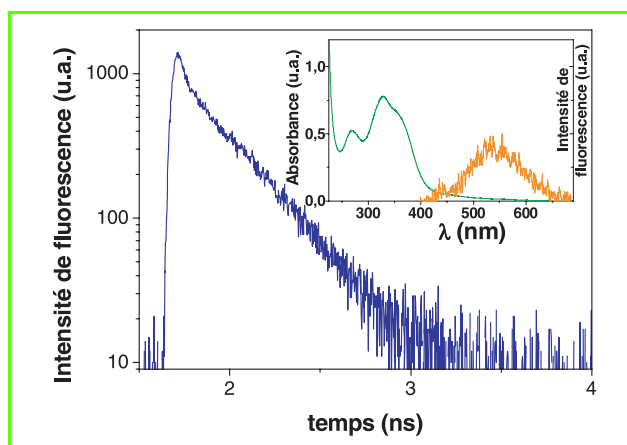


Figure 3 - Cinétique de déclin de l'émission de fluorescence de l'anti-intégrase en solution (40 µM) après excitation à 760 nm.

Dans l'encadré, spectres d'absorption (vert) et d'émission de fluorescence (orange) de la molécule en solution aqueuse.

fluorescence de l'anti-intégrase n'est pas une simple exponentielle. On mesure deux durées de vie de 45 ps et 350 ps (1 ps = 10<sup>-12</sup> s) correspondant chacune à un type de rotamère (*tableau 1*).

Sur la base de ces données, nous avons localisé et analysé l'émission de fluorescence de l'inhibiteur au sein de cellules HeLa. Sur les images d'intensité de fluorescence de la *figure 4*, on observe clairement que celle-ci est émise principalement au niveau du cytoplasme de la cellule (dans ces conditions d'analyse, le signal d'autofluorescence cellulaire est négligeable par rapport à celui de l'anti-intégrase). Ces variations de rendement de fluorescence en fonction de la localisation intracellulaire peuvent provenir (i) soit de différentes concentrations locales du médicament, la membrane nucléaire jouant alors le rôle de barrière à la pénétration, (ii) soit de modifications de l'environnement immédiat de l'inhibiteur. En effet, comme il est précisé dans l'*encadré 2*, la sensibilité aux conditions du milieu de la molécule (pH, viscosité, complexation...) peut entraîner une augmentation ou une extinction de sa fluorescence, ce que ne permettent pas d'identifier les mesures d'imagerie d'intensité de fluorescence. Il était donc nécessaire de compléter ces mesures d'intensité de fluorescence par des mesures de FLIM. L'analyse de ces images a permis d'estimer une durée de vie de fluorescence moyenne  $\tau_m$  comprise entre 0,76 et 0,88 ns (1 ns = 10<sup>-9</sup> s) identique en tout point sondé de la cellule (*figure 4*). Ce résultat permet d'affirmer que les variations d'intensité de fluorescence observées sur l'image de la *figure 4* résultent bien de différents gradients de concentrations locales de l'inhibiteur au sein de la cellule.

L'analyse de la distribution des durées de vie obtenue en milieu cellulaire par comparaison à celle obtenue en solution

Tableau 1 - Durées de vie de fluorescence  $\tau_i$  de l'anti-intégrase en solution et dans des cellules HeLa déterminées à partir d'une méthode globale d'analyse (*encadré 2*).

$a_i$  représente le poids de chacune des composantes à la fluorescence totale.  $\tau_{m1}$  correspond à la durée de vie moyenne de fluorescence déterminée à partir des différentes valeurs de  $\tau_i$  et  $\tau_{m2}$ , celle obtenue par la méthode MLE (*encadré 2*).

		$\tau_1$ (ps)	$a_1$ (%)	$\tau_2$ (ps)	$a_2$ (%)	$\tau_3$ (ns)	$a_3$ (%)	$\tau_{m1}$ (ns)	$\tau_{m2}$ (ns)
solution		45	70	350	30			0,280	
milieu cellulaire	noyau	63	60	440	32	1,98	8	1,12	0,80
	cytoplasme	63	61	448	32	2,00	7	1,08	0,85



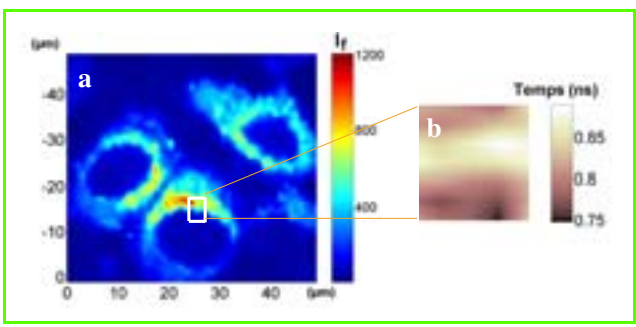


Figure 4 - (a) Image de l'intensité de fluorescence ( $I_f$ : nombre de photons pour une porte temporelle de 10 ms) (en fausses couleurs) sous excitation biphotonique ( $\lambda_{exc} = 760$  nm) de l'inhibiteur de l'intégrase du VIH (ajouté dans une cellule HeLa non infectée à la concentration de 40  $\mu$ M) obtenue avec une puissance moyenne de quelques  $mW/cm^2$ : image de 50  $\times$  50  $\mu$ m, déplacement du balayage laser par pas de 1  $\mu$ m. (b) Image de durée de vie moyenne (méthode MLE, encadré 2) de l'inhibiteur en milieu cellulaire résultant de l'acquisition des déclins de fluorescence sur la surface matérialisée par un encadré blanc sur la figure (a) : 5  $\times$  5  $\mu$ m par pas de 1  $\mu$ m (25 points).

est répertoriée dans le *tableau I*. On constate que l'on retrouve *in vivo* les deux durées de vie de fluorescence caractéristiques des deux types de rotamères de l'inhibiteur révélant que chacune des formes pénètre dans la cellule jusqu'au sein du noyau. L'augmentation sensible des durées de vie en milieu cellulaire, par rapport à celles mesurées en solution, est une observation courante lorsque les processus de désactivation non radiatifs de dissipation de l'énergie avec le solvant sont limités comme c'est le cas. Par ailleurs, on mesure une nouvelle composante de durée de vie nanoseconde, non observée en solution. Cette composante reflète une interaction non spécifique de l'un des deux rotamères avec les composants cellulaires, celui de plus courte durée de vie pour lequel le facteur  $a_1$  diminue en milieu cellulaire (*tableau I*). Ce résultat est particulièrement

important d'un point de vue pharmacologique puisqu'il suggère que la synthèse d'une 2-styrylquinoline substituée bloquée dans une forme rotamérique augmenterait la spécificité de l'inhibiteur en milieu cellulaire.

Cette localisation intracellulaire de l'inhibiteur ne laisse rien présager de son site d'action dans des cellules infectées. Rappelons que ces molécules interagissent avec l'enzyme virale intégrase dont l'action se manifeste au niveau du cytoplasme cellulaire par la formation d'un complexe de pré-intégration avec l'ADN viral, puis au niveau du noyau en catalysant l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN génomique. Nous avons ainsi cherché à identifier le site d'action du médicament dans des cellules infectées. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules HeLa infectées par le biais d'un vecteur lentiviral dérivé du VIH-1. Ce vecteur code pour la GFP (« green fluorescent protein ») dont l'expression dépend de l'intégration de l'ADN viral. L'émission de fluorescence de la GFP sert de signature spectroscopique du bon déroulement des étapes précoces de la réplication du VIH (pénétration, transcription inverse, intégration). Ainsi, la mesure d'intensité et de durée de vie de fluorescence au cours du temps permet de visualiser l'infection d'une telle cellule. Au moment de l'infection, on ne détecte que l'autofluorescence cellulaire (émission provenant des fluorophores endogènes de la cellule), alors qu'au bout de 24 heures, l'émission de fluorescence de la GFP (durée de vie 2,5 ns) est mesurable dans toute la cellule.

La cinétique du cycle d'infection du virus du VIH est schématisée sur la *figure 5*. Nous avons incubé l'inhibiteur avec des cellules infectées à deux temps caractéristiques suivant l'infection (PI pour « post infection ») comme indiqué sur la *figure 5*, ce qui permet d'évaluer l'efficacité de l'inhibiteur en fonction de l'étape de réplication du virus. Les images d'intensité et de durées de vie de fluorescence démontrent sans ambiguïté que l'inhibiteur ajouté au temps PI = 5 h est efficace (détection de sa durée de vie de fluorescence), alors que dans le cas d'une injection au temps PI = 10 h, la détection de l'émission de fluorescence de la GFP révèle l'inefficacité du médicament.

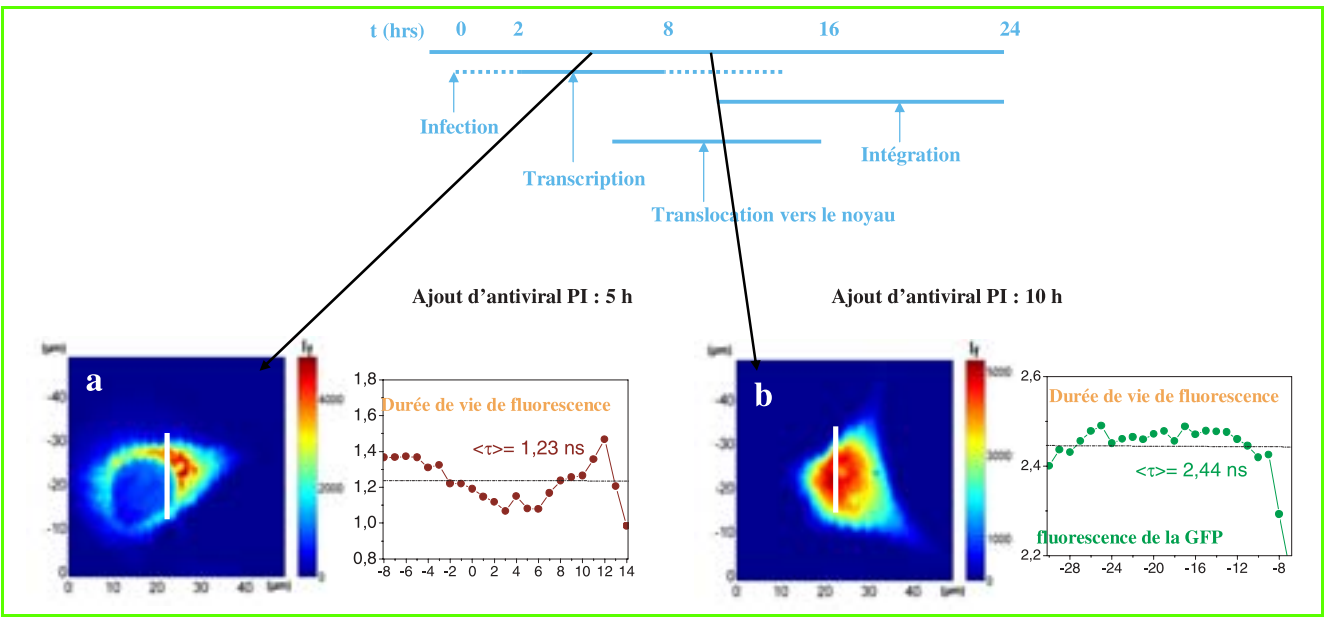


Figure 5 - Schéma cinétique du cycle d'infection du VIH. L'inhibiteur a été ajouté à deux temps caractéristiques post-infection (PI). Les images d'intensité et de durées de vie de fluorescence (a) et (b) ont été obtenues au bout de 48 heures. Leurs conditions d'acquisition sont les mêmes que celles décrites *figure 4*. (a) Les images correspondent à celles de l'inhibiteur, mettant en évidence son efficacité. (b) Les images correspondent à celles de la GFP, montrant l'inefficacité de l'inhibiteur à cette étape du cycle d'infection du virus.

Ces données nous permettent de conclure que les inhibiteurs d'intégrase de type *trans*-2 styrylquinolines font partie des antiviraux qui agissent sur les premières étapes du cycle de réplication du VIH.

## Application de la microscopie de fluorescence résolue en temps (FLIM) pour le diagnostic précoce de cancers de la vessie

Les cancers de la vessie, avec ~ 8 000 nouveaux cas par an, représentent la 8<sup>e</sup> cause de mortalité par cancer (~ 3 000 décès par an).

De nombreux arguments cliniques, épidémiologiques et expérimentaux, suggèrent que les tumeurs urothéliales de la vessie sont inductibles par des carcinogènes endogènes et exogènes. Il s'agit en particulier du tabac et de carcinogènes industriels (colorants, amines aromatiques, benzène...). Le pronostic des patients atteints dépend principalement du degré d'invasion de la maladie : une atteinte locale et superficielle a aujourd'hui de bonnes chances de guérison alors qu'une maladie infiltrant le muscle ou avec atteinte métastatique présente un pronostic peu favorable. Le diagnostic précoce des tumeurs malignes est donc essentiel pour améliorer la probabilité de succès des thérapies, ce qui justifie les efforts réalisés pour favoriser le dépistage de ce type de cancers.

Le protocole de diagnostic initial vésical, puis la surveillance des malades pendant et après traitement, peuvent être réalisés par des moyens radiologiques (échographie de la vessie, urographie intraveineuse, scanner pelvien), mais aussi par des examens de pathologie cellulaire (cytoscopie, biopsie, cytologie urinaire). Plusieurs approches sont en effet nécessaires, en fonction de la nature des tumeurs vésicales. Par exemple, dans le cas de tumeurs superficielles, les lésions papillaires sont bien reconnues par la cytoscopie et classiquement par l'histologie, alors que les lésions muqueuses planes précancéreuses et cancéreuses posent un problème de détection précoce car elles sont difficilement observables par cytoscopie conventionnelle en lumière blanche. Dans ce cas, la cytologie urinaire est particulièrement importante.

L'objectif que nous poursuivons en collaboration avec les Dr Pascal Eschwège (Laboratoire de chirurgie expérimentale, Hôpital du Kremlin-Bicêtre) et Sophie Ferlicot (Service d'anatomie et de cytologie pathologiques, Hôpital du Kremlin-Bicêtre) est de parvenir à identifier sur des cytologies urinaires, les cellules de « bas grade » de malignité en utilisant l'autofluorescence dynamique intracellulaire comme facteur de contraste. Les retombées attendues seraient d'une part un nouvel outil pour le diagnostic non invasif et précoce en cancérologie, notamment comme un premier examen de dépistage pour des populations à risque (professionnel surtout), et d'autre part une augmentation significative du succès des thérapies.

La fluorescence endogène des milieux cellulaires est un indicateur naturel de leur activité métabolique ; les teneurs et les propriétés des fluorophores des cellules lésées ou pathologiques pouvant être différentes de celles des cellules saines, cela induit d'importantes variations de l'intensité de la fluorescence émise. Les fluorophores endogènes des cellules susceptibles d'être excités par effet biphotonique sont peu nombreux : ce sont des composés tels que le NAD(P)H, les flavines et riboflavines (flavines liées à des

protéines) oxydées et les porphyrines naturelles [14-15] absorbant dans le domaine spectral proche UV et visible (350-450 nm). Les caractéristiques de fluorescence de ces entités biologiques dépendent fortement de leur état d'oxydoréduction et par conséquent du métabolisme cellulaire [16-17].

Le domaine d'émission du NAD(P)H et des flavines (400-600 nm) est bien adapté au système de détection implanté sur IDEFIX. Nos premières mesures ont ainsi porté sur différentes lames cytologiques urinaires en sélectionnant la longueur d'onde d'excitation laser à 780 nm afin de couvrir l'excitation biphotonique de chacun de ces deux fluorophores endogènes. La *figure 6* montre les images en transmission de cellules saines et tumorales (on notera l'importante variation du rapport nucléocytoplasmique entre les deux types de cellules), ainsi que celles de l'intensité d'autofluorescence obtenues sous excitation à deux photons. On observe que les distributions d'intensité relatives à chaque type de cellule sont notablement différentes (*figure 6b* et *f*). La mise en place d'un filtre interférentiel à 550 nm permet de mettre en évidence une

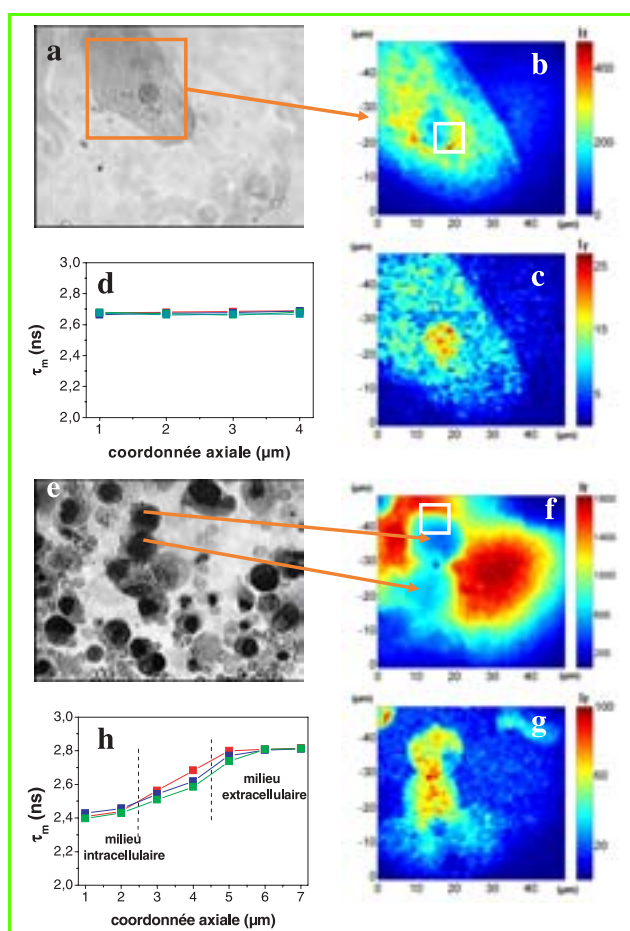


Figure 6 - Images en transmission (100 × 100 μm), sous illumination en lumière blanche, de cellules urinaires (a) saines et (e) tumorales. (b), (c), (f) et (g) : images d'intensité d'autofluorescence de ces mêmes cellules saines (b et c) et tumorales (f et g) sous excitation biphotonique à 780 nm et avec une puissance moyenne incidente de quelques mW/cm<sup>2</sup> : images de 50 × 50 μm par déplacement du faisceau laser par pas de 1 μm. (b) et (f) : images obtenues en plaçant un filtre interférentiel à 550 nm devant le détecteur de la fluorescence. (c) et (g) : images enregistrées en utilisant un filtre interférentiel à 450 nm. (d) et (h) : images de durées de vie moyennes de fluorescence d'une cellule saine et tumorale respectivement résultant de l'acquisition des déclins de fluorescence sur les surfaces matérialisées par un carré blanc sur (b) et (f).

forte émission de fluorescence des cellules saines, principalement au niveau du cytoplasme, alors qu'une quasi-extinction de la fluorescence des cellules tumorales est observée. Si l'on considère que le domaine spectral sélectionné avec ce filtre correspond à celui des flavines et/ou des flavoprotéines, nous pouvons en conclure que ces protéines, dans les cellules tumorales, sont en faible concentration et/ou ont perdu leurs propriétés natives. Une autre observation d'importance que l'on peut faire à partir des figures 6b et f est l'absence de détection de fluorescence extracellulaire pour les cytologies saines. En revanche, une forte émission centrée à 550 nm est observée dans le cas des cytologies malignes. Cette discrimination, encore inexplicée, mérite sans doute d'être exploitée en tant que paramètre de diagnostic de malignité.

En présence d'une sélection spectrale dans le domaine d'émission de fluorescence du NAD(P)H (420-470 nm), l'intensité d'autofluorescence est plus élevée au niveau du noyau que du cytoplasme des cellules saines ou tumorales (figure 6c et g). On observe par ailleurs que l'émission dans ce domaine spectral est 10 à 20 fois plus faible qu'autour de 550 nm (figure 6b et f). Le renseignement essentiel que l'on obtient à partir de ces mesures est qu'il n'existe pas de différence de l'émission de fluorescence du NAD(P)H entre cellules saines et tumorales et que celle-ci est faible comparée à celle des flavoprotéines.

Ces mesures d'imagerie d'intensité de fluorescence ont été complétées par des données FLIM (figures 6d et h). Dans le cas des cellules saines, la durée de vie de fluorescence moyenne est identique en tout point de la cellule (figures 6a) et est compatible avec celle des flavines (2,5-2,8 ns) [15]. Cette observation confirme celle de la figure 6b, à savoir que l'autofluorescence des cellules saines provient essentiellement de ce type de protéines.

Dans le cas des cellules malignes, la durée de vie de fluorescence moyenne (2,4 ns) est significativement plus faible que celle obtenue pour les cellules saines (2,7 ns). On peut raisonnablement conclure de ce résultat qu'au sein de cellules cancéreuses, à la fois les flavoprotéines et le NAD(P)H (durée de vie de fluorescence mesurée *in vitro* ~ 1-1,5 ns [18]) contribuent au signal d'autofluorescence cellulaire.

L'imagerie d'intensité et de durées de vie d'autofluorescence se révèle donc être une méthode efficace pour suivre la fluorescence endogène de cellules urinaires et permettre une discrimination des zones saines et tumorales au sein d'une lame de cytologie. Dans chaque type de cellule, la différenciation peut se faire par la mesure de la concentration locale de NAD(P)H et des flavines/flavoprotéines (imagerie d'intensité) et par l'analyse des propriétés physico-chimiques de chaque type de protéines (mesures FLIM). Nous pensons avoir démontré par cette étude que les mesures de FLIM appliquées à la détection de cellules tumorales de « bas grade » de malignité méritaient d'être poursuivies en tant qu'outil de diagnostic. Sur le plan expérimental, nous comptons approfondir ce type d'études au moyen du système d'excitation multipoints précédemment décrit qui nous permettra une détermination extrêmement rapide (cadence vidéo) des durées de vie de fluorescence.

## Conclusion

Les travaux de recherche décrits ici ont permis de montrer que la microscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps est un outil performant pour l'étude des

assemblages biologiques aussi bien isolés que *in situ*. L'utilisation conjointe des différents systèmes de détection accessibles avec cette technique permet de couvrir un large domaine d'études, s'étendant de l'analyse topologique et structurale d'entités cellulaires et tissulaires en liaison avec leur réactivité à la caractérisation des interactions moléculaires et leur dynamique.

L'instrumentation IDEFIX développée pour ces études utilise le principe de l'optique non linéaire de l'excitation à deux photons au moyen d'un laser femtoseconde qui, outre ses avantages uniques en terme de confinement spatial (encadré 1), a aussi démontré ses performances pour exciter un grand nombre de fluorophores endogènes ou exogènes et étudier leur dynamique à partir de quelques picosecondes. Nous avons aussi montré que ces travaux ouvraient la voie à la mise au point de nouveaux systèmes d'imagerie (système MIM) spécifiquement adaptés aux systèmes biologiques à étudier.

L'une des avancées attendues de ces développements et applications en imagerie est de permettre leur intégration au sein d'un plateau technique permettant un transfert de savoir-faire à une large communauté de biologistes et de médecins. Le Centre de photonique biomédicale du Centre Laser du projet POLA de l'Université Paris Sud a cette vocation qui permettra sans nul doute, dans les années à venir, de faire des avancées significatives dans le domaine des sciences biomédicales.

Mais l'utilisation de la microscopie biphotonique et plus généralement de l'optique non linéaire sollicite également le savoir-faire des chimistes. En effet, de nombreuses études démontrent la nécessité de mettre au point de nouvelles sondes photo-activables (marqueurs, nanocristaux, nanoparticules...) devant répondre à la fois à des critères d'intensification du signal détecté et de non-toxicité pour les applications biomédicales. Ces développements constituent aujourd'hui encore un axe de recherche novateur en biophotonique.

## Remerciements

Les auteurs remercient vivement les Dr Elvire Guiot (Institut d'Optique, Université Paris XI Orsay), Mironel Enescu (chercheur associé au CNRS) et Pascal Pernot (Université Paris Sud) qui ont activement participé à ce travail. Ils remercient également le CNRS, l'Université Paris Sud Orsay, la Région Ile-de-France Sud, la Fondation pour la Recherche Médicale et le Conseil Général de l'Essonne (CPER POLA) pour avoir permis le financement de l'instrumentation IDEFIX.

## Références

- [1] Dubois A., Vabre L., Boccara A.C., Beaufort E., *Applied Optics*, **2002**, 41, p. 805.
- [2] Lévêque-Fort S., Selb S., Pottier L., Boccara A.C., *Optics Communications*, **2001**, 196, p. 127.
- [3] Morjani H., Aouali N., Belhoussine R., Veldman R.J., Levade T., Manfait M., *International Journal of Cancer*, **2001**, 94, p. 157.
- [4] Sandt C., Sockalingum G.D., Aubert D., Lèpau H., Lepouse C., Jaussaud M., Leon A., Pinon J.M., Manfait M., *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**, 41, p. 954.
- [5] Moreaux L., Sandre O., Blanchard-Desce M., Mertz J., *Opt. Lett.*, **2000**, 25, p. 320.
- [6] Denk W., Piston D.W., Webb W.W., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, **1995**, 28, p. 445.
- [7] Guiot E., thèse n° 2001PA112307, **2001**.
- [8] Guiot E., Georges P., Brun A., Fontaine-Aupart M.-P., Bellon-Fontaine M.-N., Briandet R., *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75, p. 570.



- [9] Lévêque-Fort S., Penon J., Fontaine-Aupart M.-P., Roger G., Georges P., *Proceedings SPIE Confocal, Multiphoton and Non linear Microscopic Imaging*, **2003**, sous presse.
- [10] O'Connor D.V., Philips D., *Time Correlated Single Photon Counting*, Academic Press, London, **1984**.
- [11] Draajer A., Sanders R., Gerritsen H.C., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, **1995**, 31, p. 491.
- [12] Zouhiri F., Mouscadet J.-F., Mekouar K., Desmaële D., Savouré D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair C., d'Angelo J., *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, p. 1533.
- [13] Burdujan R., d'Angelo J., Desmaële D., Brochon J.-C., Tauc P., Auclair C., Mouscadet J.-F., Tfibel F., Enescu E., Fontaine-Aupart M.-P., *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2001**, 3, p. 3797.
- [14] Gordon Scott T., Speencer R.D., Leonard N.J., Weber G., *J.A.C.S.*, **1970**, 92, p. 687.
- [15] Visser A.J., *Photochem. Photobiol.*, **1984**, 40, p. 703.
- [16] Mottin S., thèse n° 1993INPG4206, **1993**.
- [17] Etori D., thèse n° 1996PA132005, **1996**.
- [18] Couprie M.E., Mérola F., Tauc P., Garzella D., Delhoué A., Hara T., Billardon M., *Rev. Sci. Instrum.*, **1994**, 65, p. 1485.
- [19] Maus M., Cotlet M., Hofkens J., Gensch T., De Schryver F.C., *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, p. 2078.
- [20] Eaton D.F., *Pure & Applied Chemistry*, **1990**, 62, p. 1631.
- [21] Blandin P., Mérola F., Brochon J.-C., Trémeau O., Ménez A., *Biochemistry*, **1994**, 33, p. 14643.



S. Lévêque-Fort



K. Steenkeste



P. Lacroix



F. Tfibel

**Sandrine Lévêque-Fort**<sup>1</sup> est chargée de recherche CNRS, **Karine Steenkeste**<sup>2</sup> est post-doctorante (financée par l'ARC), **Pascaline Lacroix**<sup>3</sup> est doctorante, **Francis Tfibel**<sup>4</sup> est maître de conférences et **Marie-Pierre Fontaine-Aupart**<sup>5</sup> est directeur de recherche CNRS au Laboratoire de photophysique moléculaire d'Orsay\*.



M.-P. Fontaine-Aupart

\* UPR 3361 du CNRS, Université Paris Sud Orsay, 91405 Orsay Cedex.

Tél. : 01 69 15 73 64. Fax : 01 69 15 67 77.

Courriels :

<sup>1</sup> sandrine.fort@ppm.u-psud.fr

<sup>2</sup> karine.steenkeste@ppm.u-psud.fr

<sup>3</sup> pascaline.lacroix@ppm.u-psud.fr

<sup>4</sup> francis.tfibel@ppm.u-psud.fr

<sup>5</sup> marie-pierre.fontaine-aupart@ppm.u-psud.fr

## La verrerie hermétiquement étanche sans graisse et ultra propre Bagues d'étanchéité PTFE Glindemann®



Informations techniques : [www.glindemann.net](http://www.glindemann.net), [dglinde@aol.com](mailto:dglinde@aol.com).

Une alternative économique et étonnamment efficace aux manchons et bouchons en PTFE pour joints coniques en verre. Les fuites sont extraordinairement faibles : Taux de fuite d'air < 10<sup>-8</sup>...10<sup>-6</sup> mBar \* Litre / sec. Taux de fuite de solvant < 0.1...0.03 mg/jour. Température -200...+300 °C. Utiles pour le stockage hermétique de produits chimiques et d'échantillons dans des pots en verre ou bien des appareils. Adaptent aux pinces en plastique pour joints. La verrerie chimique pharmaceutique et organo-métallique et l'échantillonnage de chimie environnementale sont quelques-unes des nombreuses applications.



50 bagues en PTFE sur un tube pour un joint de 29 mm.  
L'anneau ne se déforme pas et est réutilisable.  
Prix : environ 25 Euros par paquet de 50 bagues PTFE.

Distributeurs et numéros de catalogue : (Aldrich, Carl Roth (Roth-Sochiel), Fisher Scientific, Quadrolab (Sodipro), VWR)  
[www.glindemann.net](http://www.glindemann.net)  
GLINDEMANN cherche un distributeur français en France.

