

# Recherche bibliographique sur la microscopie optique non linéaire et les marqueurs fluorescents à deux photons pour la biologie

Thomas Huault

M2R optique et radio-fréquence - Institut National Polytechnique de Grenoble

**Résumé :** *La microscopie à deux photons est certainement l'outil d'investigation biologique in-vivo le plus performant du moment. Au cours de ce document, nous présenterons l'état de l'art actuel de cette technique, décrivant tout d'abord les aspects généraux justifiant l'emploi de cette méthode puis nous décrirons les différents types de marqueurs fluorescents utilisés dans ce cadre en se dirigeant au final vers la présentation d'études récentes réalisées en ingénierie des sondes fluorescentes. La première partie de ce document sera consacrée à la justification du choix des sources bibliographiques employées pour rédiger ces lignes, comprenant le choix et l'évolution du choix des mots clés ainsi qu'une étude de la qualité des travaux utilisés par une analyse statistique de la notoriété des auteurs et de leurs travaux.*

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Analyse de la recherche bibliographique</b>	<b>2</b>
1.1	Méthodologie . . . . .	2
1.1.1	Identification des mots clés . . . . .	2
1.1.2	Mots clés utilisés . . . . .	2
1.1.3	Analyses des résultats pour les principaux mots-clés . . . . .	2
1.1.4	Justification du choix des sources . . . . .	3
1.2	Problèmes rencontrés . . . . .	3
<b>2</b>	<b>Microscopie non-linéaire : étude de nouvelles sondes fluorescentes</b>	<b>3</b>
2.1	Historique . . . . .	3
2.1.1	Dates importantes[4][13][3] . . . . .	3
2.1.2	Acteurs actuels . . . . .	4
2.2	Microscopie de fluorescence par excitation des transitions d'absorption à deux photons	4
2.2.1	Fluorescence par excitation des transitions d'absorption à deux photons[3][14][6][1]	4
2.2.2	Intérêt de l'utilisation de la fluorescence à deux photons en microscopie[3][6][2][11]	5
2.2.3	Effets limitant la résolution en imagerie de fluorescence à deux photons : saturation, diffusion chimique et photoblanchiment[3][9][12] . . . . .	5
2.3	Marqueurs fluorescents par excitation de la transition d'absorption à deux photons[10]	6
2.3.1	Marqueurs exogènes . . . . .	6
2.3.2	Marqueurs endogènes[7] . . . . .	6
2.3.3	Les nouveaux marqueurs fluorescents à deux photons . . . . .	7
<b>3</b>	<b>Conclusion</b>	<b>8</b>

# 1 Analyse de la recherche bibliographique

Cette partie a pour but d'éclairer le lecteur sur la méthode de recherche employée pour procéder à l'écriture de cette bibliographie. Elle présente le cheminement de l'auteur au cours de son travail d'identification des sources pertinentes en partant de la recherche des mots clés jusqu'à l'évaluation de la qualité des publications et de la notoriété de leurs auteurs par une méthode statistique qui influera directement sur le choix des sources.

## 1.1 Méthodologie

### 1.1.1 Identification des mots clés

Afin d'identifier clairement les mots clés à employer pour la recherche thématique, le plus approprié était dans un premier temps de se procurer une revue qui serait susceptible de contenir un état de l'art complet de la microscopie non-linéaire. Par chance, dans le volume de décembre du journal Nature, une référence dans le domaine a publié l'article "Deep Tissue Two Photon Microscopy", qui a permis de déterminer la plupart des mots-clés en exploitant le vocabulaire employé pour sa rédaction.

En recherchant ces premiers mots-clés dans les bases de données, il n'a pas été très long de reconnaître les termes utilisés pour décrire les marqueurs fluorescents et l'ingénierie tournant autour.

### 1.1.2 Mots clés utilisés

Two-photon, fluorescence, non-linear microscopy, two-photon microscopy, multiphoton fluorescence, two-photon probes, fluorophore, absorption cross section, in-vivo imaging.

### 1.1.3 Analyses des résultats pour les principaux mots-clés

Afin d'évaluer la qualité des mots clé, il a été utilisé une méthode statistique en comptabilisant le nombre de publications par mots-clés par année depuis 1990 (aux années antérieures, aucune publication n'a été recensée).

Pour exemple, voici les résultats trouvés pour le mot-clé Two-Photon (figure 1).

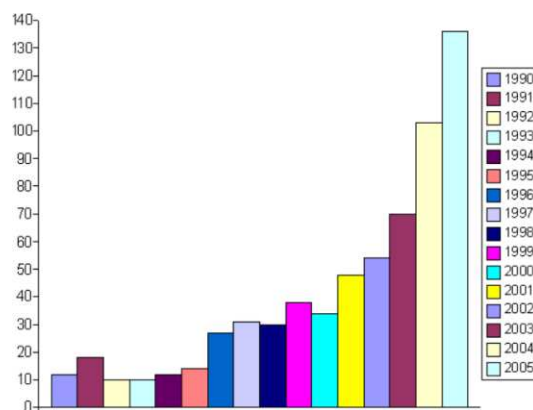


FIG. 1 – Nombre de publications recensées par année pour le mot-clé Two-Photon

#### 1.1.4 Justification du choix des sources

Pour avoir une première évaluation de la qualité d'une publication et de l'importance de la contribution apportée par l'auteur avec son travail, on peut rechercher le nombre de fois où l'article aura été cité.

Même si seule une lecture et une analyse du contenu d'une publication peuvent permettre de juger de la pertinence des travaux présentés pour la réalisation d'une bibliographie, la popularité de la publication peut donner un premier renseignement sur sa qualité.

Par exemple, pour l'article de W. Webb de 1990 paru dans *Science*, on relève un total de 995 citations dans les travaux d'autres chercheurs, tous journaux confondus, ce qui s'approche des  $\frac{3}{4}$  des publications parues. On peut donc penser que cet article ainsi que ses auteurs font référence dans le domaine.

C'est de cette manière que nous procéderons notamment pour déterminer quels seront les acteurs incontournables en microscopie non-linéaire.

## 1.2 Problèmes rencontrés

La fluorescence à deux photons est un domaine très vaste et il est aisé de se perdre dans un surplus de détails techniques. Puisqu'il n'aurait pas été raisonnable de se tenter à réaliser une introduction sur tous les domaines couverts par le sujet, il a fallu faire un choix dans ce qu'il n'était pas nécessaire à la compréhension de base de l'influence de l'excitation à deux photons. Notamment, une grande partie d'introduction sur la microscopie de fluorescence classique confocale aurait pu trouver sa place dans ces lignes mais le but recherché n'était pas de faire une historique de la microscopie.

C'est donc pour cela que l'étude se dirige essentiellement sur les marqueurs fluorescents.

## 2 Microscopie non-linéaire : étude de nouvelles sondes fluorescentes

La microscopie de fluorescence par excitation à deux photons, basée sur les phénomènes faisant intervenir deux étapes quantiques simultanées, est une évolution des techniques conventionnelles de microscopie de fluorescence classique. La nature même de l'excitation à deux photons lui confère des avantages par rapport aux techniques classiques qui en fait un instrument d'imagerie pour la biologie d'une très bonne résolution comme nous allons le voir dans les parties qui vont suivre.

### 2.1 Historique

#### 2.1.1 Dates importantes[4][13][3]

C'est en 1931 que la première démonstration théorique de la possibilité d'absorber plus d'un photon au cours de la même étape quantique a été établie par Maria Goeppert-Mayer. Cependant, étant un effet non linéaire lié à une très forte concentration de photons dans un faible volume, la première visualisation expérimentale n'a pu se réaliser qu'à partir de l'apparition des sources laser et c'est en 1961 que W. Kaiser et C. Garrett relate dans un article paru dans le *Physiological Review Letter* la première vérification expérimentale de l'absorption simultanée de deux photons par une molécule de  $CaF_2 : Eu^{2+}$ . La même année a vu apparaître le premier microscope confocal, dont le Brevet a été déposé par M. Minski aux Etats-Unis, et qui est à la base de toute la microscopie de fluorescence telle que nous la connaissons aujourd'hui.

Il a fallu ensuite attendre jusqu'en 1990 pour que Winfried Denk, encadré par Watt W. Webb, conçoive le premier microscope à deux photons, signant ainsi le début officiel de la recherche mondiale sur la microscopie à deux photons.

Dans les années qui ont suivies, et jusqu'à maintenant, la technique est globalement restée inchangée, en revanche, des applications se sont développées, notamment en terme d'imagerie intravitale.

Les études réalisées actuellement portent sur l'optimisation des marqueur fluorescents à deux photons qui jusqu'en 2003 étaient majoritairement de nature moléculaire. Suite à cette date, de nouveaux marqueurs à base de nano-cristallites ont commencé à voir le jour et, récemment (juin 2005) des nanoparticules d'or ont été utilisées pour l'imagerie intravitale.

### 2.1.2 Acteurs actuels

La microscopie de fluorescence à deux photons a réellement commencé dans les années 1990 avec Winfrid Denk et Watt Webb de l'École de physique appliquée et d'ingénierie du département de physique de l'université Cornell à Ithaca (USA) qui ont depuis multiplié leurs travaux, Denk étant alors l'étudiant de Webb, qui font maintenant référence en terme d'imagerie de fluorescence à deux photons.

Bien qu'ils aient collaboré avec énormément de chercheurs, ont retrouvé principalement à leurs côtés deux personnes, Karel Svoboda des laboratoires Bell et Fritjof Helmchen du Max Planck Institut.

Les travaux de Serge Charpak de l'ESPCI (Paris; France) ainsi que de Jérôme Mertz actuellement au département d'ingénierie biomédicale de l'université de Boston sont également de très bonnes références.

## 2.2 Microscopie de fluorescence par excitation des transitions d'absorption à deux photons

La microscopie de fluorescence par excitation des transitions d'absorption à deux photons, ou non-linéaire, fait appel à un processus appelé la fluorescence par excitation des transitions d'absorption à deux photons.

Matériellement, elle est basée sur le même principe que la microscopie de fluorescence classique (microscope confocal).

### 2.2.1 Fluorescence par excitation des transitions d'absorption à deux photons[3][14][6][1]

En focalisant très fortement un faisceau laser intense, au col du faisceau la concentration de photons est telle qu'une molécule située en ce point aura la possibilité d'absorber deux photons simultanément. C'est le processus d'absorption à deux photons prédit par Goepert-Mayer en 1931 lors de sa description théorique des processus quantiques faisant intervenir deux étapes quantiques simultanées, puis vérifié expérimentalement par W. Kaiser en 1961.

La molécule va donc se trouver dans un état excité et va se désexciter en émettant un seul photon d'énergie deux fois supérieure à celle des photons excitateurs. Ce processus peut se généraliser à une absorption multiple simultanée de plusieurs photons. La probabilité de transition de ces états est très faible en comparaison à l'absorption d'un photon unique, d'où la nécessité de disposer d'une puissance laser suffisante (lasers de type Sa:Ti ou Nd:YAG pulsés) pour obtenir une très grande concentration volumique de photons.

De ce fait, la microscopie non-linéaire va présenter un avantage majeur dans l'imagerie en trois dimensions des systèmes vivants : la fluorescence non linéaire n'ayant lieu qu'en un point localisé et dont la position dans le milieu sera contrôlable par une simple translation d'une lentille afin de modifier l'emplacement du point de focalisation autorise une excellente qualité de résolution pour une imagerie à trois dimensions.

### 2.2.2 Intérêt de l'utilisation de la fluorescence à deux photons en microscopie[3][6][2][11]

Un défis majeur de la microscopie est l'imagerie intra-vitale. En effet, la matière vivante est un milieu exclusivement hétérogène présentant des variations importantes d'indice de réfraction sur des échelles de distances faibles. Les phénomènes de diffusion vont donc être omniprésents et auront tendance à limiter la résolution de l'imagerie.

Dans le cas de la fluorescence à un photon, le faisceau incident exciteur présentera des photons dont l'énergie sera suffisante pour faire passer toutes les molécules marquant le milieu à imager dans un état excité. Le faisceau étant rapidement diffusé, des marqueurs n'étant pas situé directement dans le champ d'investigation vont également se retrouver dans un état excité et ré-émettre de la lumière qui sera à son tour diffusée comme vont l'être les photons émis dans le bon volume d'imagerie.

La diffusion pose donc un réel problème car malgré des techniques optiques pour limiter spatialement le faisceau de retour, il n'est pas évident de pouvoir effectuer un tri entre les photons ballistiques (non diffusés) et les photons diffusés.

Dans le cas de l'utilisation de marqueurs fluorescents à deux photons, l'absorption non linéaire ne se fera qu'au point focal d'un faisceau laser où la densité de photons sera suffisante pour exciter les transitions à deux photons. Une excitation à deux photons permettra également d'utiliser des sources dont les longueurs d'onde sont plus longues, donc moins diffusés (diffusion proportionnelle à  $\frac{1}{\lambda^4}$ ).

### 2.2.3 Effets limitant la résolution en imagerie de fluorescence à deux photons : saturation, diffusion chimique et photoblanchiment[3][9][12]

Une cause de la perte de résolution en microscopie de fluorescence par excitation des transitions à deux photons est directement liée à l'efficacité de la fluorescence à deux photons qui va se traduire par une diminution de l'intensité de luminescence. Il y a trois raisons à ce phénomène.

Lors de l'excitation des molécules, celles-ci sont originellement dans un état fondamentale d'énergie. Leur état excité va présenter une certaine durée de vie inversement proportionnelle à la probabilité de désexcitation de la molécule. En fonction de la durée de vie de cet état, la population de molécules dans l'état fondamentale va varier. Que ce soit par une excitation par un laser continu ou impulsif, cette durée de vie va faire qu'à un moment, le niveau fondamental sera complètement dépeuplé : c'est la saturation de la transition. L'efficacité de fluorescence va alors diminuer car dépendant directement de la probabilité de présence de molécules dans l'état fondamental.

Dans le cas de l'imagerie intra-vitale, comme la visualisation des vaisseaux capillaires dans le cerveau d'une souris, le volume d'excitation correspondant au volume focal du faisceau laser est bien plus faible que le volume contenant les marqueurs fluorescents. Il va donc en résulter que l'efficacité de fluorescence dans le volume total va dépendre de la concentration en molécules marqueurs ainsi que de leur capacité à diffuser dans le volume.

Le dernier effet limitant l'efficacité de fluorescence dépend quant à lui de la puissance du laser exciteur et du nombre de fois qu'un marqueur sera excité.

Dans le cas d'une molécule, l'absorption à deux photons et la ré-émission d'un photon sont liées à des réactions photochimiques. A force de réaliser ces réactions, les liaisons concernées par la photochimie vont se fragiliser puis céder. Le marqueur ne sera plus utilisable pour la fluorescence. C'est le photoblanchiment de la transition.

## 2.3 Marqueurs fluorescents par excitation de la transition d'absorption à deux photons[10]

Tous les marqueurs fluorescents à un photon présentent des propriétés de fluorescence à deux photons. L'efficacité du processus de chaque marqueur va dépendre essentiellement de la section efficace d'absorption à deux photons. Pour l'imagerie microbiologique, on cherchera des marqueurs possédant une bonne section efficace d'absorption à deux photons ainsi que des qualités essentielles comme la non-toxicité ou la diffusibilité qui devra être adaptée à l'application étudiée (par exemple, le marquage de cellules uniques).

Il existe principalement deux techniques de marquage en imagerie de fluorescence: le marquage exogène et le marquage endogène.

Au cours de la partie qui va suivre, nous allons dresser un bref état de l'art concernant les marqueurs fluorescents à deux photons puis nous verrons quelles sont les dernières avancées en ingénierie des marqueurs.

### 2.3.1 Marqueurs exogènes

Les marqueurs exogènes sont des composés moléculaires ou nano-cristalytes injectés dans l'organisme à imager. Cet organisme pourra être aussi bien une cellule qu'un animal entier (imagerie de la capillarisation veineuse cérébrale d'une souris).

- *Marqueurs moléculaires* [14]:

Les marqueurs moléculaires sont des molécules présentant généralement des cycles et qui selon les cas seront soit hydrosolubles soit organo-solubles.

En fonction des applications recherchées, on choisira différents types de molécules. Certaines auront la propriété de marquer le flot sanguin, d'autres pourront pénétrer le noyau des cellules ou marquer seulement leur cytoplasme.

Les marqueurs moléculaires sont soumis à tous les effets que nous avons décrit précédemment et représentent la plupart du travail de recherche qui a été effectué en microscopie de fluorescence à un et deux photons.

- *Les nanocristalytes*[8]:

Les nanocristalytes sont des nano-cristaux semi-conducteurs présentant des propriétés de fluorescence à un et deux photons lors d'une excitation par lumière laser. Ces cristaux sont généralement toxiques mais peuvent être encapsulés dans une membrane, les rendant ainsi très hydrosolubles.

La fluorescence de ces cristaux est basée sur l'effet photoélectrique décrit par A. Einstein. Les photons absorbés vont d'abord créer une paire électron-trou en emmenant un électron situé dans la bande de valence du cristal vers sa bande de conduction. L'électron et le trou en se recombinant vont alors émettre un photon dont l'énergie sera égale à l'énergie de gap du cristal.

Ces cristaux possèdent un spectre d'excitation large pour des raies d'émission très fines. Leur section efficace d'absorption est de loin plus importante que celle des marqueurs moléculaires et sont plus résistants aux photoblanchissements des transitions.

### 2.3.2 Marqueurs endogènes[7]

Le marquage endogène est le résultat de la transcription dans l'ADN d'une protéine présentant des propriétés de fluorescence. De part cette caractéristique, il sera possible de procéder à un marquage globale ou ciblé, avec des couleurs différentes, en s'arrangeant pour que la protéine soit exprimée soit dans la totalité des cellules de l'organisme (cas des animaux fluorescents) soit de manière très ciblée sur un groupe particulier de cellules ou un organe précis.

La nature même du marquage résout le problème de toxicité car directement inclus dans les gènes de l'animal.

Cette technique permet par exemple de marquer un certain type de tumeur avec une RFP (Red Fluorescent Protein) avant son injection pour étude et de marquer le reste de l'organisme de l'animal avec une GFP (Green Fluorescent Protein), faisant ainsi apparaître la tumeur en rouge sur fond vert.

### 2.3.3 Les nouveaux marqueurs fluorescents à deux photons

La plupart des marqueurs fluorescents à deux photons sont à la base développés pour l'imagerie de fluorescence à un seul photon. Par conséquent, l'efficacité de fluorescence dépendant de la section efficace d'absorption à deux photons est très limitée, et ceci du fait que cette section efficace ne sera pas optimisée pour l'excitation à deux photons.

La solution à ce problème est de développer des marqueurs dont la section efficace d'absorption à deux photons est maximisée. C'est donc dans cette voie que les recherches actuelles sont orientées. Nous allons maintenant présenter deux nouveaux marqueurs fluorescents spécifiquement étudiés pour optimiser la section efficace d'absorption à deux photons et dont les travaux ont été récemment publiés.

- *Fluorescence par excitation à deux photons de la molécules GMO-4* [5]:

En utilisant le fait qu'une molécule constituée d'une structure symétrique du type D- $\pi$ -cycle aromatique- $\pi$ -D (D = donneur,  $\pi$  = intercalant conjugué), un groupe constitué d'une collaboration entre chimistes et physiciens ont élaboré une molécule présentant une section efficace d'absorption à deux photons très largement supérieure à celle des molécules courantes à une longueur d'onde d'excitation aux alentours de 530 nm. Cette molécule semble également présenter un autre maximum de sa section efficace dans une région du spectre lumineux comprise entre 650 nm et 700 nm, champ qui n'a pu être exploré dans son entier du fait de la limitation de leurs lasers excitateurs. Le maximum de fluorescence de la molécule se situe dans le bleu à 450 nm, soit dans la même gamme que sa fluorescence par excitation à un photon.

- *Fluorescence par excitation à deux photons de nano-baquettes d'or*[13]:

La fluorescence de particules de métaux nobles est un processus équivalent à la fluorescence des nanocristaux semi-conducteurs. Ce processus a été décrit comme présentant trois étapes. La première est l'absorption d'un photon faisant passer un électron de la bande de valence à la bande de conduction. La paire électron-trou ainsi créée va alors diffuser dans le matériau puis se recombiner en dispersant une partie de son énergie dans le réseau de phonons du matériau (particules traduisant une vibration collective des atomes) et en émettant un photon. Il a été montré que ce processus, valable aussi bien à un qu'à deux photons, était d'autant plus efficace que le matériau était excité à sa fréquence plasma (résonance des plasmons de surface).

Les nano-particules d'or étudiées ici présentent un maximum d'absorption à deux photons à la longueur d'onde correspondant à la fréquence plasma du matériau soit à 820 nm. Sa fluorescence se fait sur une bande spectrale allant de 400 nm à 650 nm pour des absorptions à deux photons comprises entre 700 nm et 900 nm.

### 3 Conclusion

Nous venons de réaliser un bref état de l'art de la microscopie de fluorescence par excitation des transitions à deux photons.

Au cours du document, nous avons pu voir que les études expérimentales sur ce domaine avaient débuté essentiellement à partir de 1990, même si la théorie de ces phénomènes a été établie il y a plus de 70 ans de cela avec une première démonstration expérimentale de la fluorescence par excitation à deux photons dans les années 60.

Après avoir décrit les avantages et effets influant dans cette méthode, nous avons vu quels étaient les types de sondes fluorescentes mises en oeuvre en microscopie de fluorescence pour terminer sur deux découvertes récentes concernant les marqueurs spécifiques à la fluorescence à deux photons.

Comme l'ont montré les analyses sur les différents mots-clés et publications, les travaux portant sur les domaines de la microscopie de fluorescence par absorption à deux photons connaissent une croissance quasi-exponentielle avec les années.

L'apparition de nouvelles technologies liées à l'exploration du micro et nano-monde vont sans aucun doute contribuer prochainement à l'élaboration de nouvelles sondes aux propriétés directement dictées par des effets de la physique à ces échelles, offrant alors des marqueurs présentant des sections efficaces d'absorption à deux photons qui iront toujours en s'accroissant.

## Références

- [1] M. Albota, D. Beljonne, J-L. Bredas, J.E. Ehrlich, J-Y. Fu, A. A. Heikal, S.E. Hess, T. Kogej, M.D. Levin, S.R. Marder, D. McCord-Maughon, J.W. Perry, H. Röckel, M. Rumi, G. Subramaniam, W.W. Webb, and W-L. Wu an C. Xu. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections. *Science*, 281, September 1998.
- [2] E. Beaurepaire, E. Chaigneau, and J. Mertz. Ultra-deep two-photon fluorescence in turbid media. *Optics Communications*, 188:25–29, February 2001.
- [3] W. Denk, J.H. Strickler, and W.W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248:73–76, April 1990.
- [4] W. Denk and K. Svoboda. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, 18:351–357, March 1997.
- [5] Ali Hayek, Frédéric Bolze, Jean-François Nicoud, Patrice L. Baldeck, and Yves Mély. Synthesis and characterization of water-soluble two-photon excited blue fluorescent chromophores for bioimaging. *Journal of the European Society for Photobiology and Photochemistry*, 5, January 2006.
- [6] F. Helmchen and W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2, December 2005.
- [7] P.M. Hoffman. Advantages of multi-color fluorescent proteins for whole body and vivo cellular imaging. *Journal of Biomed. Optics*, July/August 2005.
- [8] D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise, and W.W. Webb. Water soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in-vivo. *Science*, 300, May 2003.
- [9] J. Mertz. Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy. *Eur. Journal of Phys. D*, 3:53–66, 1998.
- [10] J. Mertz. Nonlinear microscopy: new techniques and applications. *Current Opinion in Neurobiology*, 14:610–616, 2004.
- [11] M. Oheim, E. Beaurepaire, J. Mertz, and S. Charpak. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *Journal of Neuroscience Methods*, 111:29–37, July 2001.
- [12] P. Vérant, R. Serduc, J.A. Coles, R. Farion, C. Rémy, B. Van Der Sanden, and J.C. Vial. A method for measuring cerebral blood volume of mouse using multiphoton laser scanning microscopy. *Pro. of SPIE*, 5463, 2004.
- [13] H. Wang, T.B. Hulf, D.A. Zweifel, W. He, P.S. Low, A. Wei, and J-X. Chang. In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *PNAS*, 102, November 2005.
- [14] C. Xu and W.W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross section of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. of A.*, 13, March 1996.