



HAL
open science

Imagerie 3D résolue en temps pour l'aide au diagnostic médical : développement d'un système de microscopie de fluorescence multipoints sous excitation à deux photons.

Ariane Deniset-Besseau

► To cite this version:

Ariane Deniset-Besseau. Imagerie 3D résolue en temps pour l'aide au diagnostic médical : développement d'un système de microscopie de fluorescence multipoints sous excitation à deux photons.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT: . tel-00391729

HAL Id: tel-00391729

<https://theses.hal.science/tel-00391729>

Submitted on 4 Jun 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS XI

UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Thèse de doctorat de l'Université de Paris XI d'Orsay
Spécialité : Chimie-Physique

Imagerie 3D résolue en temps pour l'aide au diagnostic médical : développement d'un système de microscopie de fluorescence multipoints sous excitation à deux photons.

Présentée par
M^{me} Ariane DENISET-BESSEAU

Pour obtenir le grade de Docteur en sciences de l'Université Paris XI

Soutenue le 08 Février 2008 devant la commission d'examen composée de :

M.	Pierre SEBBAN, <i>LCP, Université Paris-Sud, Orsay</i>	Président
M ^{me}	Geneviève BOURG-HECKLY, <i>BioMoCeTi, Genopole, Evry</i>	Rapporteur
M.	Robert B. PANSU, <i>PPSM, CNRS, ENS Cachan</i>	Rapporteur
Mr	Paul W. FRENCH, <i>Imperial College, London</i>	Examineur
M ^{me}	Marie-Pierre FONTAINE-AUPART, <i>LPPM, CNRS, Orsay</i>	Directrice de thèse
M ^{me}	Sandrine LEVEQUE-FORT, <i>LPPM, CNRS, Orsay</i>	Co-encadrante

Thèse effectuée conjointement

au Laboratoire de Photophysique Moléculaire, CNRS UPR 3361, Université Paris-Sud et au Centre de Photonique Biomédicale, Centre Laser de l'Université Paris-Sud.

REMERCIEMENTS

Avant d'entrer dans le vif du sujet, je tiens à sincèrement remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé, échangé, interagi, discuté et rigolé. Merci pour ces moments partagés, bons ou mauvais car ils finissent par tous nous enrichir. Merci à ceux qui ont contribué de près ou de loin à me donner le goût des sciences et de la recherche. Que ce soit pendant ma scolarité, pendant les stages et même pendant les loisirs puisque l'histoire a vraiment débuté au cours d'un stage d'archéologie, il y a 10 ans...

Ce travail de thèse a été réalisé conjointement au Laboratoire de Photophysique Moléculaire et au Centre de Photonique BioMédicale à l'Université Paris XI Orsay.

En premier lieu, je tiens à remercier M. Philippe Bréchnac de m'avoir accueillie au sein du LPPM et d'avoir mis à ma disposition tous les outils et les moyens pour pouvoir réaliser ce travail d'en d'excellentes conditions.

Je tiens à remercier également les membres du jury, Geneviève Bourg-Heckly et Robert Pansu qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail, Pierre Sebban qui a bien voulu présidé ce jury et Paul French d'avoir accepté d'être examinateur d'un manuscrit écrit en français et d'avoir fait le déplacement depuis Londres.

Pour continuer, je souhaite remercier les personnes de l'équipe avec lesquelles j'ai le plus travaillé.

Je remercie chaleureusement Marie-Pierre Fontaine-Aupart, ma directrice de thèse, qui m'a donné l'opportunité de travailler sur un sujet passionnant. Merci de m'avoir laissé évoluer en toute liberté sur mon sujet. Merci pour ta bienveillance, tes précieux conseils et ton optimisme. J'ai beaucoup appris pendant ces trois années.

Merci à Sandrine Lévêque-Fort. Je tiens à te remercier tout particulièrement car tu as eu la patience de m'amener sur les chemins escarpés du « mont optique » et de m'avoir fait confiance au point de me laisser manipuler 'MMM'. Je t'en suis sincèrement reconnaissante. Merci pour Sukkothai, la tarte à la rhubarbe et ton soutien discret pendant les moments difficiles. Merci également pour ces bons moments passés pendant le tutorat puisque ce sont eux qui, en quelque sorte, m'ont décidé à faire cette thèse.

Merci à Karine pour toutes les discussions que nous avons eu, pour tes conseils toujours posés et mesurés et pour ta gentillesse. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi.

Un grand merci à Sandrine Lécart : grâce à toi la culture cellulaire ne m'est plus complètement inconnue. Ta rigueur et ton sens de l'organisation m'ont permis d'avancer dans la bonne direction. Merci pour tes nombreux « conseils biologiques ».

Bien sur ce travail n'aurait pu aboutir sans la collaboration de nombreuses personnes : que ce soit pour la partie instrumentale comme pour la partie biomédicale. Par conséquent, je remercie sincèrement Gérard Roger et Patrick Georges du Laboratoire Charles Fabry à l'Institut d'Optique qui nous ont permis de mettre en place et de développer les différents prototypes du montage MMM.

Je voudrais également vivement remercier le Dr. Pascal Eschwege pour son enthousiasme, ses discussions passionnantes et pour avoir suivi ce sujet dans toutes ces évolutions. La salle d'op n'est jamais très loin !

Je remercie également le Dr Mireille Laroudie qui m'a permis de travailler sur des cytologies du col de l'utérus du laboratoire d'analyse de Bièvres. Et de très chaleureux remerciements à Basile Maldant qui m'a beaucoup aidé en me fournissant tous les échantillons dont j'avais besoin.

Un grand merci au Dr Bashir Lwaleed, qui a gentiment accepté de me fournir des lignées cellulaires résistantes (directement en provenance du « Southampton hospital ») sans lesquelles toute une partie de mon travail de thèse n'aurait pu aboutir.

Pour les opérations « sauvetage laser » effectuées par Christophe Lefumeux et les pièces de mécaniques réalisées au dernier moment ou dans l'urgence par Didier Roux, merci à tous les deux pour le soutien techniques et les améliorations qui ont pu ainsi être apportées. Merci en général au service électronique, mécanique et instrumentation pour toutes les fois où je les ai sollicités pour des broutilles.

Un grand merci à Sandrine Ermisse et Annie Brielles qui m'ont facilitée la vie du point de vue administratif.

Je souhaite également remercier toutes les personnes du PPM, du CPBM et d'ailleurs, permanents, stagiaires ou thésards qui ont contribué à rendre cette thèse agréable : je pense à Pascaline Gueux, Guillaume Dupuis et bien d'autre...

Merci à Francis Tfibel pour son extrême gentillesse. Malheureusement, je suis arrivée un peu tard au labo pour pouvoir plus échanger avec vous.

Merci à Chantal Jucha pour son agréable présence...les petites pauses « thé-papote » pendant la rédaction vont me manquer.

A mes camarades de fortune et d'infortune, Pierre et Lama : bon courage et bonne chance pour la suite.

Enfin, du plus profond de mon cœur un immense merci à ceux qui me sont proches, **amis et parents**...qui ont eu la patience de me soutenir pendant ces trois ans, qui ont su m'entourer de leur affection. Sans vous, certains projets n'auraient pu aboutir. Merci n'est sans doute pas assez fort ... tous les moments que j'ai vécus avec vous m'ont permis de me construire et de tenir le cap.

A mes parents sans qui je ne serais pas là...

A Anthony mon yang.

TABLE DES MATIERES

Introduction : Contexte de l'étude et généralités 5

Partie I : Mise en place et optimisation d'un système de microscopie multipoints sous excitation à deux photons

I.1.	Introduction.....	25
I.2.	Optimisation du microscope multiphotons multipoints (MMM).....	28
I.2.1.	Les éléments constitutifs du dispositif.....	28
I.2.1.1.	<i>Le système optique d'excitation multipoints.....</i>	<i>28</i>
I.2.1.2.	<i>Le système de détection.....</i>	<i>33</i>
I.2.1.3.	<i>L'interface pilotage/traitement.....</i>	<i>36</i>
I.2.2.	Les performances.....	39
I.2.2.1.	<i>Résolution axiale et latérale.....</i>	<i>39</i>
I.2.2.2.	<i>Influence des paramètres d'excitation et de détection sur le signal de fluorescence.....</i>	<i>42</i>
I.2.3.	Les limitations et les solutions technologiques potentielles.....	43
I.3.	L'imagerie de fluorescence 4D (x, y, z, t).....	45
I.3.1.	Des premiers essais sur des billes fluorescentes... ..	45
I.3.2.	...vers les premiers échantillons biologiques.....	46
I.3.2.1.	<i>Echantillons cellulaires fixés.....</i>	<i>46</i>
I.3.2.2.	<i>Etude d'un photosensibilisateur en milieu cellulaire.....</i>	<i>50</i>
I.3.2.2.1.	<i>Mode d'action des photosensibilisateurs.....</i>	<i>51</i>
I.3.2.2.2.	<i>Le PPME : état des connaissances.....</i>	<i>52</i>
I.3.2.2.3.	<i>Propriétés photophysiques du PPME libre et solubilisé dans des liposomes.....</i>	<i>53</i>
I.3.2.2.4.	<i>Etude en milieu cellulaire : Imagerie résolue en temps par MMM.....</i>	<i>55</i>
I.3.2.2.5.	<i>Interprétations.....</i>	<i>59</i>
I.4.	Conclusion.....	61
	Annexe A : Matériels et Méthodes.....	65
	Références.....	69

Partie II : La microscopie de fluorescence au service du diagnostic précoce de cancers

II.1.	Problématique de l'étude.....	75
II.2.	Le modèle d'étude : le cancer du col de l'utérus.....	75
II.2.1.	Anatomie du col de l'utérus.....	75
II.2.2.	Pathologie.....	77
II.2.3.	Le diagnostic.....	79
II.2.4.	La coloration du matériel cytologique.....	81

II.3.	La microscopie de fluorescence pour améliorer la sensibilité du diagnostic ...	82
II.3.1.	Propriétés photophysiques des colorants du papanicolaou et des fluorophores cellulaires endogènes	82
II.3.2.	Identification de la fluorescence des lames cytologiques du col utérin	88
II.3.2.1.	<i>Cellules normales versus cellules tumorales</i>	88
II.3.2.2.	<i>Conclusion</i>	100
II.4.	Validation de la méthode sur les lames atypiques	101
	Annexe B : Matériels et Méthodes	105
	Références	109
<u>Partie III : Détection par imagerie de fluorescence de la résistance à une polychimiothérapie des cancers urothéliaux</u>		
III.1	Ojectif de l'étude	115
III.2	Modèle d'étude : le cancer urothélial.....	115
III.2.1.	Anatomie pathologique	115
III.2.2.	Traitements standards des cancers urothéliaux	117
III.2.3.	La résistance aux agents chimiothérapeutiques dans les tumeurs urinaires ...	118
III.2.3.1.	<i>Mécanismes généraux de résistance aux agents antitumoraux du MVAC</i>	118
III.2.3.2.	<i>Techniques existantes pour la détection de la MDR</i>	120
III.3.	Etudes spectroscopiques du MVAC : de la solution au milieu cellulaire	120
III.3.1.	Présentation de la polythérapie MVAC	120
III.3.2.	Propriétés spectroscopiques : De la solution	122
III.3.3.	...Aux Résultats en milieu cellulaire	124
III.3.3.1.	<i>Evaluation de la dose d'agent antitumoral à utiliser</i>	125
III.3.3.2.	<i>Suivi au cours du temps de l'intégration et de la localisation de l'agent antitumoral par microscopie confocale</i>	127
III.3.3.3.	<i>Colocalisation</i>	131
III.3.3.4.	<i>Imagerie résolue spectralement et temporellement</i>	136
III.3.3.4.1.	<i>Imagerie spectrale</i>	136
III.3.3.4.2.	<i>Imagerie de durée de vie</i>	138
III.3.3.5.	<i>Bilan</i>	140
III.3.4.	...Vers un protocole expérimental pour établir un test prédictif de MDR	140
III.4.	Perspectives : Premier test clinique.....	142
	Annexe C : Matériels et Méthodes.....	144
	Références	152
	Conclusion générale	155

INTRODUCTION : CONTEXTE DE L'ETUDE ET GENERALITES

La représentation et la compréhension du monde qui nous entoure passe le plus souvent par l'image. La vision est devenue, petit à petit, le sens le plus sollicité au quotidien pour se repérer, échanger, comprendre, et interagir. Malheureusement, les capacités de l'œil humain ont leurs limites et nous sommes obligés de développer sans cesse de nouveaux systèmes optiques pour accroître ses performances et pouvoir appréhender le monde de l'infiniment grand ou de l'infiniment petit. Le milieu médical n'échappe pas à cette règle. En effet, pour établir un diagnostic fiable, notamment en oncologie, la visualisation détaillée de l'organe atteint est indispensable. Or, l'amélioration de la sensibilité et de la précision du diagnostic dépend de la qualité de l'instrumentation utilisée et du traitement de l'information qui s'en suit. Les médecins disposent actuellement d'une palette de techniques d'imagerie sans cesse optimisées, basées sur des phénomènes physiques transcrits en image : on peut citer entre autres la radiographie, l'échographie, l'IRM, la scintigraphie ou le PET (Tomographie par Emission de Positrons). Ces techniques bien que très performantes présentent chacune leurs propres limites. Par exemple, dans le cas de certains cancers (cas des poumons), les tumeurs peuvent être difficilement détectables par imagerie (radiographie) mais seront accessibles par endoscopie. Or, il s'avère que l'endoscopie en lumière blanche est peu sensible aux lésions de bas grade alors que l'un des enjeux actuels de la cancérologie réside dans la détection précoce des tumeurs pour augmenter le taux de survie des patients et simplifier les thérapies. Aussi, l'instrumentation médicale peut encore être améliorée et de nombreux champs d'investigations restent à explorer pour développer de nouvelles méthodes de diagnostic peu invasives, fiables et peu coûteuses. Il a été ainsi proposé, ces dernières années, de nouvelles solutions technologiques innovantes (les moins invasives possibles), utilisant notamment la spectroscopie de fluorescence.



Saint-Joseph charpentier (détail)
Georges de La Tour (1642), Musée du Louvre, Paris

Figure 0-1 : Peinture de Georges de La Tour illustrant les propriétés de diffusion et d'absorption de la lumière par les tissus

Les interactions lumière-matière ont intéressées très rapidement le monde du biomédical qui a voulu tirer partie des techniques comme la spectroscopie et la microscopie optique qui offrent la possibilité de visualiser divers types de tissus ou cellules de manière non invasive avec une bonne résolution.

De part sa sélectivité, sa sensibilité et la variété des facteurs de contraste qui peuvent être utilisés (intensité, spectre, durée de vie), la microscopie de fluorescence est vite devenue une technique très attractive et prometteuse. Cependant, pour être sûr d'exploiter de façon optimale ces propriétés de fluorescence, il est important de déterminer le matériel et les molécules les plus adaptés au système étudié pour ne pas obtenir d'interprétations ambiguës.

Par conséquent, la présentation du travail, effectué au cours de cette thèse, sera précédée d'un bref rappel sur les principes des processus de fluorescence et des technologies qui en découlent. Ces notions seront la clé pour pouvoir, par la suite, appréhender les diverses techniques qui ont été utilisées au cours de ce travail.

I. La fluorescence

L'utilisation des propriétés de diffusion et d'absorption de la lumière par les tissus et de leur émission de fluorescence, comme outil de diagnostic pour détecter et mesurer des variations locales pouvant apparaître au sein de ces derniers, n'est pas récente. Ainsi, dès 1831, Richard Bright examina le crâne d'un patient hydrocéphale en transparence à l'aide d'une bougie. En 1924, A. Policard mit à jour le comportement de certains tissus cancéreux soumis à un rayonnement lumineux et remarqua la fluorescence naturelle des tumeurs éclairées sous lumière UV chez le rat. Et, dans les années 1960, on commença à introduire les fluorophores exogènes, notamment avec la mise au point et l'utilisation des premiers photosensibilisateurs aussi bien pour leur effet curatif en photothérapie que pour l'aide au diagnostic par fluorescence (un bref rappel sur la photothérapie et les photosensibilisateurs est rapporté dans la partie I, [1]).

D'un point de vue historique, le terme de fluorescence est introduit par G.G. Stokes au milieu du 19^e siècle. Il désigne le processus de désexcitation par émission de photons qui permet à une molécule excitée (l'état excité S_n est peuplé après l'absorption de photons) de retourner dans son état fondamental (S_0) [2-6]. Cependant, la fluorescence n'est pas l'unique voie de désexcitation pour une molécule excitée et plusieurs cas de figures peuvent se présenter [7-9] :

- La conversion interne : il s'agit d'une transition non radiative qui correspond au retour direct à l'état fondamental S_0 sans émission de fluorescence (désignée par IC sur la Figure 0-2).
- La conversion intersystème : c'est également une transition non radiative entre deux niveaux vibrationnels de même énergie appartenant chacun à des niveaux électroniques de multiplicité différente (ISC sur la Figure 0-2). Le retour à l'état fondamental pourra alors se faire par émission de phosphorescence.
- Les transferts de charge intramoléculaires et les changements de conformation constituent également d'autres voies possibles de désexcitation.

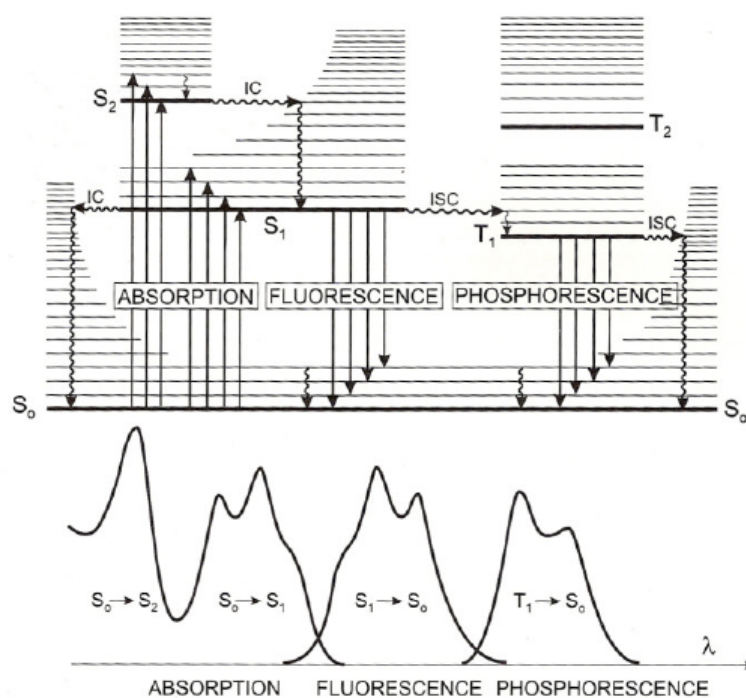


Figure 0-2 : Diagramme de Perrin-Jablonski et illustration des positions relatives des spectres d'émission, de fluorescence et de phosphorescence, tiré du livre de B. Valeur [6]

Les interactions de l'état excité avec d'autres molécules de l'environnement peuvent aussi entrer en compétition avec les désexcitations citées ci-dessus (Figure 0-2). Ces réactions comprennent les transferts d'électrons, de protons ou d'énergie et les formations d'excimères ou d'exciplexes. Toutes ces voies de désexcitation vont concurrencer l'émission de fluorescence, à condition que ces processus aient lieu à des échelles de temps comparables à la durée de vie moyenne de la molécule dans son état excité. Cette durée de vie moyenne représente d'ailleurs la fenêtre temporelle durant laquelle on peut observer la dynamique des événements.

Les grandeurs qui caractérisent le processus d'émission de fluorescence, soient son rendement quantique, son spectre et sa durée de vie moyenne, sont affectées par tous les processus de désexcitation de l'état excité ainsi que par les interactions qui peuvent se développer entre l'état excité de la molécule et son environnement proche. Par conséquent, tout changement observé sur les grandeurs caractéristiques de l'émission de fluorescence peut apporter des renseignements sur son micro-environnement. Les paramètres chimiques et physiques caractérisant le microenvironnement de la molécule peuvent également influencer son émission de fluorescence [10] : le pH, la polarité du solvant, la viscosité du milieu, les ions, les paramètres intensifs (thermodynamique)...

Grandeurs caractéristiques

Chaque fluorophore peut être caractérisé par des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence qui lui sont propres pour un environnement donné et qui sont caractéristiques de la structure énergétique de cette molécule. Or, seule une partie de l'énergie absorbée peut être émise sous forme de rayonnement lumineux (émission de fluorescence), moins énergétique que le rayonnement excitateur incident. Le spectre d'émission de fluorescence est, dans le cas le plus simple, l'image dans un miroir du spectre d'absorption du fluorophore (Figure 0-2).

La distance entre les maxima des spectres d'excitation et d'émission s'appelle le **déplacement de Stokes** (ou *Stokes Shift*) [7]. Expérimentalement, pour séparer efficacement l'émission de fluorescence de l'excitation résiduelle, on utilisera des miroirs dichroïques. Il faudra donc que le déplacement de Stokes ne soit pas trop faible. Idéalement, il doit être supérieur à 20 nm.

Dans certains cas, on peut remarquer que l'effet «miroir» entre spectres d'excitation et d'émission n'est pas toujours observé. En effet, des dissimilarités entre les deux spectres peuvent révéler l'existence de plusieurs formes de la molécule considérée.

Comme il a été énoncé précédemment, les trois autres grandeurs caractéristiques importantes de l'émission de fluorescence sont **la durée de vie moyenne de l'état excité**, **le rendement quantique** et le **coefficient d'extinction molaire**.

On donne la **durée de vie de fluorescence**, τ_f (ou durée de vie l'état excité S_1), d'une molécule par rapport aux différentes voies de désexcitation [11] définies par leur constante de réaction :

k_r^S la constante de réaction pour les processus de désexcitation radiatifs avec émission de fluorescence $S_1 \rightarrow S_0$ (temps caractéristiques 10^{-10} - 10^{-7} s)

k_{ci}^S la constante de réaction pour les processus de conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$ (temps caractéristiques 10^{-11} - 10^{-9} s)

k_{cis}^S la constante de réaction pour les processus de conversion intersystème (temps caractéristiques 10^{-10} - 10^{-8} s)

Plus généralement, on définit une seule constante représentant les processus de désexcitation non radiatifs k_{nr}^S qui est la somme de la constante k_{ci}^S et de la constante k_{cis}^S . La durée de vie de l'état excité S_1 du fluorophore est ainsi donnée par la relation suivante :

$$\tau_f = \frac{1}{(k_r^S + k_{nr}^S)} \quad (1)$$

Le plus souvent, on utilise en biologie, en biochimie ou dans le domaine biomédical, des fluorophores ayant une durée de vie de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde.

Le rendement quantique ϕ_f représente l'efficacité de l'émission de fluorescence pour une molécule donnée. Il est défini comme la proportion de molécules excitées retournant dans leur état fondamental par émission de fluorescence. Le rendement quantique d'une molécule fluorescente sera idéalement compris entre 0,1 et 1. On le définit par la formule suivante :

$$\phi_f = \frac{k_r^S}{(k_r^S + k_{nr}^S)} = \frac{\tau_f}{\tau_r} \quad (2)$$

avec τ_r la durée de vie radiative de l'état excité S_1

La troisième grandeur caractéristique, le **coefficient d'extinction molaire** ϵ , reflète la probabilité pour une molécule d'absorber un photon de longueur d'onde donnée. Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des colorants car plus ϵ est grand, plus la fluorescence sera élevée à intensité lumineuse incidente égale.

On peut alors définir l'**intensité de fluorescence** ou « **brillance** » d'une sonde qui est déterminée par le produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique de fluorescence.

Pour une étude par imagerie de fluorescence quantitative, on cherchera à avoir une relation linéaire entre la concentration de fluorophore et l'intensité de signal de fluorescence.

La durée de vie de fluorescence et le rendement quantique de fluorescence sont des grandeurs d'une importance majeure. Par exemple, plus le rendement quantique de fluorescence est grand, plus il sera facile d'observer les fluorophores. Cependant, nous ne devons pas oublier que ces deux paramètres peuvent être influencés par la température, le pH ou la polarité du microenvironnement.

Choix du fluorophore

Le succès de la fluorescence en tant qu'outil d'investigation pour étudier la structure ou la dynamique de systèmes vivants est dû à la grande sensibilité des techniques utilisées et à la capacité de la molécule fluorescente à donner des informations spatiales et temporelles.

Comme le microenvironnement peut avoir une forte influence sur l'émission de fluorescence, les fluorophores sont souvent utilisés comme sondes dans l'étude de systèmes physicochimiques, biochimiques et biologiques [12]. Ces sondes peuvent être de différentes natures : il peut s'agir de sondes intrinsèques au système (comme le tryptophane dans les protéines ou certaines coenzymes comme NAD(P)H ou les coenzymes flaviniques [13-19]) ou de sondes extrinsèques qui développent des liaisons covalentes avec des molécules spécifiques ou non du système étudié. Typiquement, dans le cas d'études réalisées sur des cellules vivantes, l'utilisation de sondes fluorescentes nous permettra notamment de visualiser les membranes [20], les constituants spécifiques intracellulaires comme les lipides, les protéines [21, 22] ou les brins d'ADN, ou bien d'étudier des interactions entre cellules, une activité cytotoxique, les variations intracellulaires de pH ou la dynamique d'intégration de molécules exogènes (ADN viral, médicaments...).

Du fait de la sensibilité de ces sondes au microenvironnement, il faudra être particulièrement minutieux dans son choix. Dans certains cas, il sera même préférable de choisir des sondes insensibles aux changements survenant dans son environnement.

Cependant, on reproche souvent aux sondes extrinsèques (ou exogènes dans le cas d'études sur des cellules vivantes) le fait qu'elles puissent engendrer localement des perturbations sur le système étudié. Il faudra donc également être vigilant sur les propriétés physicochimiques de la molécule fluorescente, ainsi que sur sa forme et sa taille.

Les informations temporelles que l'on peut obtenir par l'étude de l'émission de fluorescence, sont d'un intérêt majeur. La résolution temporelle peut aller jusqu'à quelques picosecondes avec les caméras à balayage de fente et une centaine de femtosecondes pour les systèmes utilisant la fluorescence up-conversion (qui procure les meilleures résolutions temporelles).

L'association technologique de la fluorescence et de la microscopie a ainsi permis de développer ces quinze dernières années des dispositifs expérimentaux offrant des possibilités de visualisation et de détection jusque là insoupçonnées. Une explosion de nouvelles technologies a vu le jour avec la création de nouvelles sondes moléculaires fluorescentes (marqueurs spécifiques des entités intracellulaires, anticorps ou protéines fluorescentes, particules de nanocristaux monodisperses colloïdaux ou Quantum-dots [23]) ainsi qu'avec l'exploitation des propriétés de fluorescence des molécules endogènes. L'utilisation de techniques d'imagerie de fluorescence comme la microscopie de fluorescence confocale et la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons, ont également amélioré la résolution spatiale et ont permis de se rapprocher de la limite de diffraction (celle-ci vaut, en première approximation, la longueur d'onde d'excitation divisée par deux).

II. Analyse de la lumière émise par fluorescence

Les techniques d'imagerie de fluorescence sont devenues de puissants outils pour les recherches dans le domaine de la biologie et des sciences biomédicales. Leurs applications sur des systèmes vivants cellulaires et les tissus ont d'ailleurs révolutionné ces domaines [24-26].

La microscopie de fluorescence conventionnelle diffère de la microscopie standard par l'utilisation d'une source lumineuse pouvant émettre de l'UV au visible. Les longueurs d'onde d'excitation sont sélectionnées à l'aide de filtres interférentiels. Malheureusement, les images obtenues avec ce dispositif sont parasitées par le signal de fluorescence généré dans les plans supérieurs et inférieurs au plan focal. Bien qu'il soit tout à fait envisageable de réaliser un traitement de l'image par informatique (déconvolution), de nouvelles techniques comme la microscopie confocale et la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons ont été mises en place pour résoudre cet inconvénient.

Microscopie de fluorescence confocale

Inventée au milieu des années 50 [27, 28], la microscopie confocale utilise une source d'excitation laser déplacée sur l'échantillon pixel par pixel dans le plan focal de l'objectif. L'émission de fluorescence générée dans l'échantillon est séparée de la source d'excitation par un miroir dichroïque placé devant le détecteur (Figure 0-3). Un trou de filtrage situé à l'entrée de ce même détecteur permet de sélectionner uniquement la fluorescence provenant du plan focal de l'objectif. On s'affranchit ainsi du signal émis hors plan focal. Le déplacement du laser est réalisé soit par des miroirs galvanométriques soit par un disque de Nipkow (disque tournant contenant de multiples trous de filtrage, arrangés en spirale [29, 30]), associé ou non à un disque de microlentilles. Un schéma détaillé d'un microscope confocal est présenté dans la partie II de ce manuscrit.

Comme les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont relativement proches, il peut être difficile de trouver des miroirs dichroïques possédant une réflectivité maximale pour la longueur d'onde d'excitation et une transmission optimale pour la longueur d'onde de fluorescence. Ceci induit malheureusement des pertes au niveau de l'intensité de fluorescence détectée.

De plus, l'utilisation d'un trou de filtrage va engendrer des pertes supplémentaires puisque seule une partie du signal total de fluorescence est collectée. Par conséquent, l'énergie d'excitation nécessaire pour réaliser une image de l'échantillon est plus importante que celle utilisée en microscopie conventionnelle. La probabilité de créer des photodommages au sein de l'échantillon est donc plus élevée. Ces effets devront être impérativement minimisés en choisissant des fluorophores très stables et des détecteurs sensibles.

Enfin, la microscopie confocale peut être combinée à un système de détection résolu temporellement et/ou à un système de détection résolu spectralement.

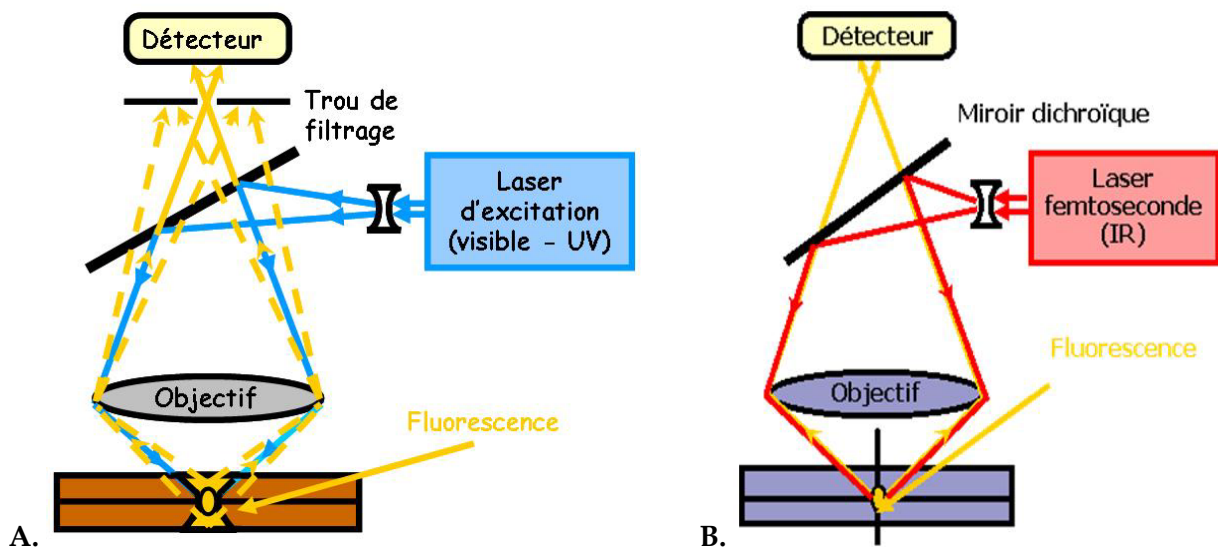


Figure 0-3 : Schémas de principe A. de la microscopie de fluorescence confocale, B. de la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons [31, 32].

Microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons

La microscopie de fluorescence biphotonique repose sur un concept démontré par Göpper-Mayer en 1931 [33, 34] : le processus non linéaire d'absorption à deux photons. Cependant, ce dernier n'a été vérifié expérimentalement qu'en 1961 par Kaiser, avec l'apparition des premières sources laser impulsives. Ce n'est que dans les années 90 que Denk et al [35-38] associe l'excitation à deux photons (EDP ou TPE « two-photon excitation ») avec la microscopie de fluorescence, ce qui révolutionna l'étude des milieux biologiques par imagerie de fluorescence.

La microscopie de fluorescence biphotonique est caractérisée par des capacités d'analyse non destructrice et d'imagerie tridimensionnelle à haute résolution spatiale et permet de pallier certains inconvénients de la microscopie de fluorescence confocale.

En microscopie de fluorescence biphotonique, les fluorophores de l'échantillon sont excités suite à l'absorption simultanée de deux photons d'énergie deux fois plus petite que celle nécessaire pour exciter directement la molécule dans son état S_1 avec un seul photon. Cette absorption se fait via un état virtuel et n'a lieu que sous certaines conditions.

Dans le cas d'une excitation à deux photons, il a été démontré que le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume varie de manière quadratique avec l'intensité incidente [39], soit :

$$N_{abs} = \delta C F^2 \quad (3)$$

où C est la concentration des fluorophores (en molécules/cm³), δ est la section efficace d'absorption à deux photons (en cm⁴.s/molécule/photon) et F est le flux de photons incidents (photons/cm²/s) donné par la relation suivante :

$$F = \frac{2}{\pi\sqrt{\pi}} \frac{P}{f} \frac{\lambda}{hc} \frac{1}{\Delta\tau \omega_0^2} \quad (4)$$

où P est la puissance moyenne du faisceau incident, f la fréquence des impulsions, $\Delta\tau$ la durée des impulsions et ω_0 le rayon de col du faisceau

Le flux de photons de fluorescence émis F_l (photons/cm².s) est alors donné par [39]:

$$F_l = KC \frac{\phi_f}{2} \delta d F^2 \quad (5)$$

où K est une constante dépendant des conditions expérimentales (incluant l'efficacité de détection, la sensibilité du détecteur en fonction de la longueur d'onde, etc), d est la distance sur laquelle l'échantillon absorbe (en cm) et ϕ_f est le rendement quantique de fluorescence.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons sont généralement très faibles, de l'ordre de 10⁻⁵⁰ cm⁴.s/molécule/photon [40]. Par conséquent, si on veut obtenir une bonne efficacité d'excitation de la fluorescence, le flux de photons incidents doit être élevé (équation 3). Il faudra donc utiliser préférentiellement des lasers impulsionsnels. Or, le flux de photons d'un laser impulsionsnel est inversement proportionnel à la durée des impulsions et au rayon de col du faisceau (équation 4). De plus, la majorité des fluorophores utilisés dans le domaine de la biologie ou du biomédical absorbent dans le domaine UV-visible. Compte tenu que l'énergie des photons nécessaire pour le processus d'absorption à deux photons doit être deux fois plus petite que celle nécessaire pour exciter directement le fluorophore dans l'état S_1 , la longueur d'onde d'excitation doit être comprise entre 690 et 1000 nm. C'est pourquoi, pour les expériences d'absorption à deux photons, on a recours à des lasers à saphir dopé au titane émettant dans le proche infrarouge (690 nm < λ < 1000 nm) et délivrant des impulsions d'environ 100 femtosecondes.

Globalement, le principe de la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons est très similaire à celui de la microscopie de fluorescence confocale (voir Figure 0-3). Le laser continu visible est remplacé par un laser impulsionsnel femtoseconde émettant dans l'infrarouge (IR) et la fluorescence est séparée de l'excitation par un miroir dichroïque. Cependant, aucun trou de filtrage n'est nécessaire. En effet, du fait des faibles probabilités de transition à deux photons, seuls les fluorophores au voisinage du point focal de l'objectif sont excités, lieu où la densité de photon est la plus grande (Figure 0-3 B), et l'émission de fluorescence n'a donc lieu qu'aux environs de ce point focal.

La mise en œuvre du système du microscope de fluorescence biphotonique est relativement simple (puisque'il n'y a pas de trou de filtrage) ; il possède une très bonne résolution spatiale (données rappelées dans la partie I) et offre plusieurs avantages par rapport à la microscopie confocale [41, 42].

Ainsi, les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont très facilement séparables puisque qu'il y a environ un facteur deux entre les deux longueurs d'onde.

En outre, comme la plupart des composants biologiques ou les sondes exogènes absorbent très peu dans le proche IR, l'utilisation de lasers impulsionsnels IR permet d'avoir une meilleure profondeur de pénétration dans les échantillons biologiques tout en limitant les photodégradations sur le trajet du faisceau. Cet avantage majeur a d'ailleurs été très largement exploité lors d'études menées sur divers échantillons épais [43-45].

Enfin, le principal avantage de la microscopie de fluorescence sous EDP est le confinement de l'excitation au point focal de l'objectif ce qui permet notamment de détecter la fluorescence totale avec très peu de bruit de fond.

Par conséquent, tous les problèmes rencontrés lors de l'excitation d'une molécule (effets thermiques, photo-blanchiment, création de photo-produits, photo-dégradation) seront limités au volume de focalisation. Cependant, de très fortes densités de puissance utilisées en régime femtoseconde à haute cadence (puissance crête de l'ordre du TW/cm²) peuvent éventuellement être plus destructives localement. Il y a donc des conditions d'excitation à respecter, notamment au niveau de la puissance moyenne des faisceaux laser excitateurs qui ne doit pas dépasser, au niveau de l'échantillon, quelques milliwatts [46, 47]. Ainsi quelques études quantitatives complètes des dommages induits par une excitation multiphotonique ont été réalisées pour définir les paramètres à contrôler lors d'applications sur cellules vivantes [48-51].

Ces différents avantages font de la microscopie de fluorescence sous EDP une technique particulièrement bien adaptée et peu destructive pour des études menées sur du matériel biologique. De ce fait, cette technique est depuis quelques années, couramment utilisée dans les expériences d'imagerie de fluorescence en milieu biologique vivant.

Etude FLIM

Classiquement, lors d'études menées sur des systèmes biologiques par imagerie de fluorescence, on mesure l'intensité de fluorescence et on enregistre des images résolues en 3-dimensions en microscopie confocale. Néanmoins, comme nous l'avons déjà remarqué, l'émission de fluorescence d'un fluorophore dépend fortement des variations physiques ou chimiques qui peuvent se produire localement. Or, ces événements sont difficilement interprétables et quantifiables si on ne considère que l'intensité de fluorescence. L'imagerie de fluorescence résolue temporellement (ou FLIM pour « Fluorescence Lifetime Imaging »), qui utilise les différences de durée de vie de fluorescence des fluorophores comme facteur de contraste, permet d'accéder à des informations complémentaires concernant les paramètres physiques (comme la viscosité) et chimiques (comme le pH) locaux, en plus des informations obtenues en régime stationnaire (tels que les spectres d'émission). L'imagerie de durée de vie couplée à l'imagerie d'intensité et de spectre de fluorescence est donc un outil de choix pour les études sur cellules vivantes. En particulier, l'autofluorescence cellulaire peut être distinguée de l'émission de fluorescence des sondes extrinsèques par des mesures de durée de vie et de spectre.

On répertorie de nombreuses applications qui utilisent les durées de vie comme facteur de contraste : c'est le cas de l'imagerie calcique [52-54] qui permet le suivi du calcium ou de l'imagerie des transferts d'énergie résonants (RET) qui permet de quantifier la distance séparant deux espèces marquées avec des fluorophores différents.

Les images de durée de vie de fluorescence peuvent être acquises soit dans le domaine fréquentiel soit dans le domaine temporel. Dans le premier cas, la source d'excitation est modulée pour pouvoir calculer la durée de vie de fluorescence à partir de la démodulation et du déphasage du signal de fluorescence. Dans le deuxième cas, l'échantillon est excité avec une impulsion ultracourte et on observe directement le déclin de fluorescence.

Domaine fréquentiel

La source d'excitation est modulée périodiquement et le détecteur (amplificateur de brillance couplé à une caméra CCD « Charge Coupled Device ») est utilisé pour mesurer la différence de phase et le facteur de démodulation entre le faisceau excitateur et le signal d'émission de fluorescence. Ces deux paramètres sont reliés à la durée de vie de fluorescence. En effet, en comparant les variations de l'un ou l'autre de ces paramètres avec celles obtenues pour des mesures réalisées sur un échantillon étalon, on peut les utiliser pour calculer les durées de vie. Le principe est résumé ci-dessous :

L'échantillon est excité par une onde dont l'intensité est modulée sinusoidalement (Figure 0-4). Soit $I_e(t)$ l'expression de l'intensité d'excitation et $I_f(t)$ l'expression de l'intensité de fluorescence (excitation monophotonique, la fluorescence est modulée à la même fréquence que l'excitation mais avec un retard) [55] :

$$I_e(t) = I_{e0} + I_{e\omega} \cos(\omega t + \varphi_e) \text{ et } I_f(t) = I_{f0} + I_{f\omega} \cos(\omega t + \varphi_f)$$

De plus, l'amplitude du signal d'émission de fluorescence est plus faible que celle de l'onde excitatrice incidente (Figure 0-4). On définit alors le facteur de démodulation M selon la formule suivante :

$$M = \frac{I_{f\omega} / I_{f0}}{I_{e\omega} / I_{e0}}$$

Dans le cas simple d'un déclin de fluorescence monoexponentiel (et une seule population de fluorophores), la durée de vie de fluorescence τ_f est reliée au retard de phase entre l'onde émise et l'onde incidente ou au facteur de démodulation selon les expressions suivantes :

$$\omega \tau_f = \tan(\Delta\varphi),$$

$$\omega \tau_f = \sqrt{\frac{1}{M^2} - 1}.$$

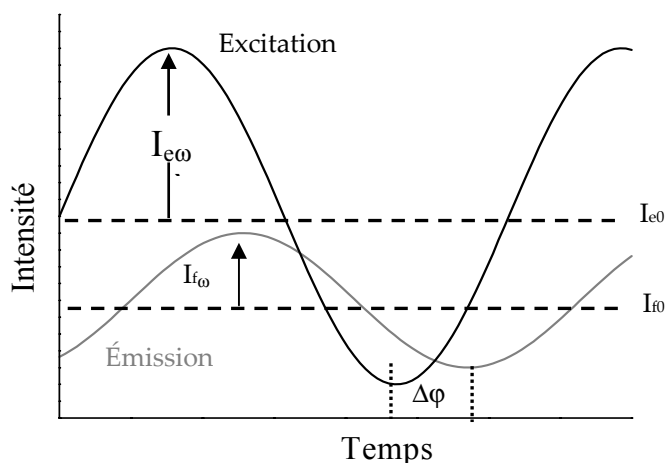


Figure 0-4 : Définition du retard de phase et du facteur de démodulation [56]

Pour obtenir une précision maximale, la valeur de ω doit être du même ordre de grandeur que l'inverse du temps de vie mesuré.

Ce type de mesure est couramment utilisé en microscopie de fluorescence sous excitation à un photon et peut être adapté à la microscopie biphotonique [57, 58].

Domaine Temporel

On distingue trois types de systèmes permettant de mesurer les durées de vie de fluorescence : les systèmes utilisant une « streak camera », ceux utilisant le comptage de photon unique (TCSPC « time-correlated single photon counting ») et les systèmes utilisant des caméras à portes temporelles.

Mesures réalisées avec une caméra à balayage de fente ou « streak caméra »

En mode prise d'image unique (single shot mode), la caméra est capable d'avoir une grande résolution temporelle (environ 300 fs). Cependant, pour améliorer le rapport signal sur bruit, il faut moyenner sur plusieurs impulsions laser.

Le schéma de fonctionnement de la caméra est illustré sur la Figure 0-5 : le signal que l'on veut mesurer est focalisé sur la fente d'entrée et est projeté sur la photocathode. Au niveau de celle-ci, un électron est créé et est accéléré jusqu'à l'anode. Le nombre de photoélectrons générés est proportionnel à l'intensité du signal lumineux arrivant sur la photocathode. Pour déterminer le profil temporel, une brusque rampe de potentiel est appliquée aux bornes des défecteurs. Ainsi, les photoélectrons arrivés les premiers sont peu déviés alors que ceux arrivant beaucoup plus tard, subissent un fort champ électrique. Ces électrons vont bombarder une galette de microcanaux pour être amplifiés avant l'écran à phosphore.

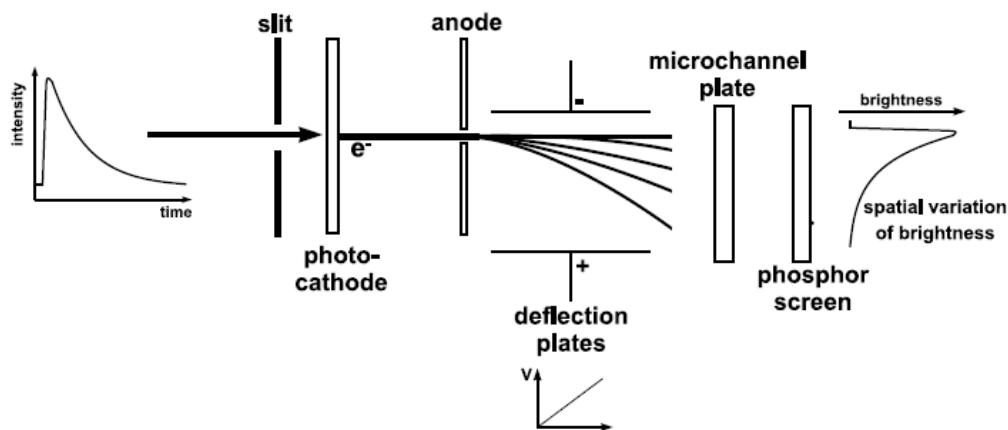


Figure 0-5 : Schéma de fonctionnement de la streak caméra : le profil temporel de l'impulsion incidente est déterminé à partir du profil d'intensité spatial produit par l'écran à phosphore [56]

Sa grande sensibilité (le comptage de photon unique est envisageable) et sa résolution temporelle font de la streak caméra un outil de choix pour mesurer les durées de vie de signaux optiques ultra courts. Mais, la caméra à balayage de fente a un coût très élevé et une mauvaise dynamique. En effet, lors de la mesure de signaux de fluorescence supérieurs à la nanoseconde, (c'est à dire une grande majorité des fluorophores utilisés en biologie), la résolution temporelle est limitée par la résolution spatiale du détecteur.

Comptage de photon unique (TCSPC)

Il s'agit du système le plus couramment utilisé dont le schéma de principe est donné en Annexe A2 [59, 60]. Le principe du comptage de photon unique repose sur le fait que la probabilité de détecter un seul photon à l'instant t après l'impulsion laser excitatrice, est proportionnelle à l'intensité de fluorescence émise à ce temps (Figure 0-6). Après l'enregistrement des photons uniques sur un grand nombre d'impulsions excitatrices, on peut reconstruire le déclin de fluorescence.

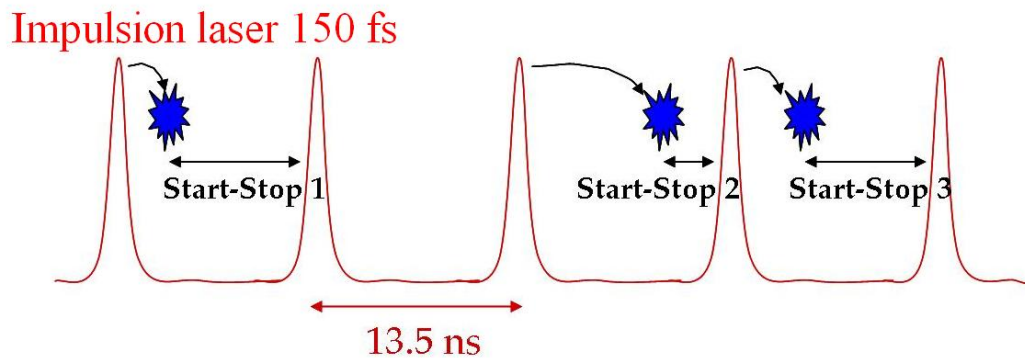


Figure 0-6 : Principe du comptage de photons uniques donné pour une impulsion laser d'une largeur temporelle de 150 fs et d'une fréquence de 76 MHz

Différents détecteurs peuvent être utilisés pour les mesures TCSPC, comme les photomultiplicateurs, les galettes de microcanaux ou les photodiodes à avalanche.

La popularité de ce système vient du fait qu'il s'agit d'une technique très bien éprouvée qui a montré son efficacité et sa fiabilité [61]. De plus, elle est relativement peu coûteuse, facile à mettre en place et on peut accéder à des résolutions temporelles, typiquement d'environ 20 ps. Malheureusement, cette technique exige des temps d'acquisition particulièrement longs.

Système caméra porte temporelle

Ce système de détection comportant une caméra CCD couplée à un amplificateur de brillance (GOI « Gated Optical Intensifier » ou HRI « High Rate Imager ») sera décrit plus précisément dans la partie I.

Brièvement, le déclin de fluorescence est échantillonné à différents temps après l'arrivée de l'impulsion laser sur l'échantillon [62]. Ainsi, dans le cas où l'on veut améliorer la vitesse d'acquisition, un système caméra porte-temporelle est une bonne alternative au comptage de photons unique puisque cette méthode présente une bonne résolution temporelle : en effet, comme cette technique est basée sur une mesure d'intensité de fluorescence, la durée d'acquisition d'un déclin est plus rapide [63]. Seule la largeur des portes temporelles utilisées lors de l'acquisition (~ 100 à 200 ps selon l'amplificateur de brillance utilisé) limitera la résolution temporelle. Cependant la détermination des durées de vie peut être très précise (précision de 10 ps – 25 ps). Le nombre de portes temporelles acquises dépend du type de traitement qui est choisi (détails dans la partie I). Celui-ci peut aller de 2 à 18, sachant que dans le cas d'une acquisition comportant deux portes temporelles, le gain en terme rapidité d'acquisition se fera au détriment de la précision des mesures.

Bilan

L'inconvénient majeur du domaine fréquentiel est le manque de convivialité pour analyser les déclins de fluorescence complexes par rapport à la visualisation facile des déclins en régime temporel. Cependant, pour des durées de vie longues, l'application du domaine fréquentiel est relativement simple à mettre en place notamment parce qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'un laser impulsionnel. De plus, une étude récente a démontré que le rapport signal sur bruit est plus grand pour des mesures réalisées dans le domaine temporel que pour des mesures réalisées dans le domaine fréquentiel [64].

Le tableau suivant résume les avantages et les inconvénients des mesures réalisées dans le domaine temporel et de celles réalisées dans le domaine fréquentiel [65].

		Avantages	Inconvénients
Domaine fréquentiel		<ul style="list-style-type: none"> -Technique rapide -Facilité d'utilisation -Pas de déconvolution de la fonction d'appareil -Performant pour des mesures de durée de vie longue -Peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> -Données enregistrées complexes -Mauvaises capacités à distinguer plusieurs exponentielles -Sensible aux photodommages -Résolution temporelle et rapport signal sur bruit plus faible que dans le domaine temporel
Domaine temporel	Système caméra porte-temporelle	<ul style="list-style-type: none"> -Vitesse d'acquisition rapide -Efficace pour des mesures de durées de vie courtes (< 1 ns) et longues (> 1 ns) 	<ul style="list-style-type: none"> -Sensible aux photodommages -Résolution spatiale dégradée avec l'écran à phosphore de l'amplificateur de brillance -Laser impulsionnel
	Comptage de photon unique ou TCSPC	<ul style="list-style-type: none"> -Permet de distinguer plusieurs exponentielles -Efficace pour des mesures de durées de vie courtes (< 1 ns) et longues (> 1 ns) -Sensible : photon unique -Conviviale / visualisation des déclins facile 	<ul style="list-style-type: none"> -Temps d'acquisition lent -Laser impulsionnel
	Caméra à balayage de fente ou streak caméra	<ul style="list-style-type: none"> -Très bonne résolution temporelle -Vitesse d'acquisition rapide -Efficace pour des mesures de durées de vie courtes (< 1 ns) 	<ul style="list-style-type: none"> -Technique coûteuse -Mauvaise dynamique -Laser impulsionnel

Finalement, le choix entre les différentes techniques dépendra de la problématique et du système étudié. Quoiqu'il en soit, les techniques de FLIM sont en constante évolution. Actuellement, on cherche plus particulièrement à améliorer les temps d'acquisition ou à intégrer au système de détection FLIM un module permettant d'accéder à une résolution spectrale.

III. Microscopie optique: Récents développements

Les microscopies de fluorescence sont sans cesse en évolution, afin d'améliorer les paramètres critiques à l'interprétation des résultats ou à l'acquisition des données, comme la résolution axiale, latérale ou la vitesse d'acquisition des données.

Différentes technologies vont être présentées succinctement. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive.

Amélioration de la résolution spatiale

Des méthodes comme la microscopie 4Pi [66-68] ont été développées dans le but d'améliorer la résolution axiale. Brièvement, deux objectifs sont disposés de part et d'autre de l'échantillon de telle sorte que leurs points focaux soient parfaitement superposés (Figure 0-7). Ce principe est utilisé pour l'excitation et/ou pour la détection. Les ondes lumineuses arrivant sur l'échantillon interfèrent donc dans le volume focal commun aux deux objectifs et la figure d'interférences créée délimite alors le volume d'excitation.

Il a été démontré qu'au niveau du premier maximum de la figure d'interférence, la résolution axiale obtenue est améliorée d'un facteur 4 à 5. Cependant la présence de maxima secondaires le long de l'axe optique complexifie la géométrie du volume d'excitation. Ce genre d'instrumentation améliore la résolution axiale, au prix d'un alignement de l'ensemble des optiques contraignant et délicat. De plus, une telle configuration limite l'étude aux échantillons biologiques fins.

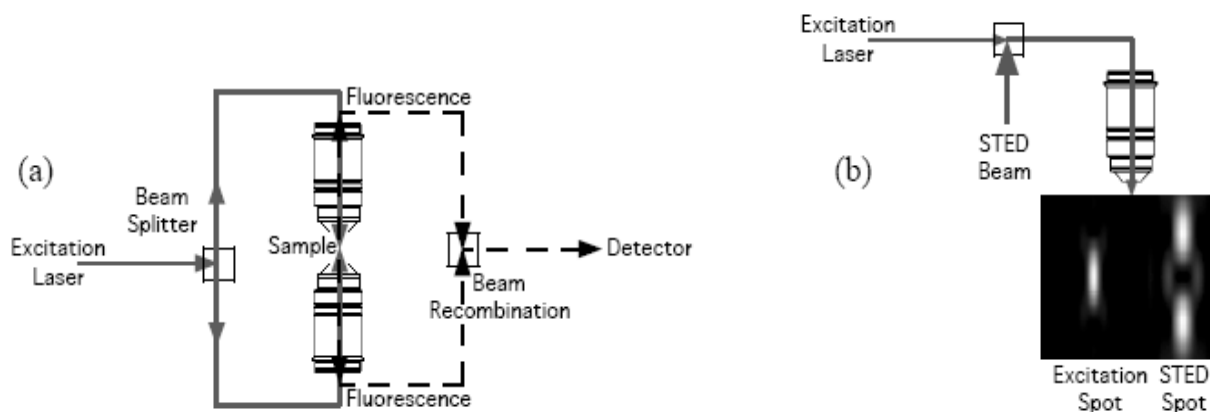


Figure 0-7 : Principe simplifié de la microscopie 4Pi (a) et du microscope STED (b) ; extrait d'un résumé de O. Haerberlé [69]

La microscopie STED (« Stimulated Emission Depletion Microscopy ») [70-72] permet de pallier ce problème et d'améliorer encore la résolution spatiale. On utilise pour cela les phénomènes quantiques décrivant la fluorescence. A l'aide d'un microscope confocal modifié, on autorise ou interdit l'émission de fluorescence dans des zones spécifiques. Plus spécifiquement, le microscope STED utilise le phénomène d'émission stimulée pour diminuer la zone d'émission de fluorescence spontanée (Figure 0-7). Cette technique a permis d'obtenir une résolution en trois dimensions de l'ordre de 100 nm.

D'autres dispositifs sont également envisageables pour améliorer la résolution spatiale comme la microscopie en réflexion totale interne (TIRF, [73]) ou l'illumination structurée.

Ces technologies permettent de repousser les limites imposées par la diffraction dont on ne peut s'affranchir en microscopie confocale ou sous EDP et ouvrent la voie vers des techniques d'imagerie en champ lointain avec une résolution nanométrique.

Amélioration de la vitesse d'acquisition

Ce dernier aspect concerne plus spécifiquement ce travail de thèse et est détaillé dans la partie I.

Le temps d'acquisition des images est un paramètre crucial pour l'étude d'échantillons biologiques vivants. Notamment, les nouveaux dispositifs d'imagerie de fluorescence sont mis au point afin de raccourcir le plus possible les temps d'irradiation des échantillons et ainsi de limiter les effets de dégradation. Les développements qui sont évoqués dans la partie I concernent la microscopie confocale et la microscopie sous excitation à deux photons.

Ce manuscrit comporte trois parties distinctes qui s'articulent autour de deux grands axes. Le premier axe est orienté vers le développement d'une nouvelle instrumentation alors que le deuxième axe s'inscrit dans le contexte de la microscopie de fluorescence au service du diagnostic médical.

Le premier objectif de ma thèse a été de mettre en place et d'optimiser un système de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons innovant, en vue d'améliorer significativement le temps d'acquisition des images FLIM. Ce domaine est en pleine expansion et suscite un vif intérêt. Notre dispositif « home made » a été validé sur différents systèmes d'intérêt biomédical notamment sur des lames de cytologies urothéliales et du col utérin, utilisées par les médecins anatomopathologistes pour le diagnostic de cancer.

A partir de ces lames cytologiques, une nouvelle méthode d'aide au diagnostic, utilisant l'intensité de fluorescence comme facteur de contraste a été élaborée au sein du laboratoire. Cette étude fait l'objet de la deuxième partie de ce travail et s'est révélée d'autant plus importante que l'un des enjeux majeur en cancérologie est de détecter le plus précocement possible les tumeurs, pour augmenter les chances de rémission chez les patients.

Enfin, la troisième partie de ce manuscrit décrit la mise en place d'un test, simple d'utilisation et peu coûteux, pour détecter les éventuelles résistances à certains agents antitumoraux des tumeurs urothéliales.

Ces travaux ont été effectués conjointement au laboratoire de Photophysique Moléculaire (LPPM) et au Centre de Photonique Biomédicale (CPBM) de l'université d'Orsay et ont été le fruit de diverses collaborations ou échanges avec les équipes suivants :

Patrick Georges et Gérard Roger du laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, CNRS, Université Paris-Sud pour la conception du microscope multiphotons multipoints ;

Lisiane Delanaye, Maryse Hoebecke et son équipe du Laboratoire de Spectroscopie Biomédicale de l'Université de Liège pour nous avoir donné l'opportunité de travailler sur leur photosensibilisateur

Basile Maldant et le Dr Mireille Laroudie du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de Bièvres pour le travail sur les cytologies cervicales ;

Le Dr Pascal Eschwege du Service d'Urologie, Hôpital de Bicêtre et le **Dr Bashir Lwaleed** du « Department of Urology », Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton General Hospital, pour le travail sur la résistance des cellules urothéliales à certains agents antitumoraux.

Références

1. Meyer-Betz, F., *Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of blood and bile pigments*. *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, 1913. **112**: p. 476-503.
2. Perrin, F., *Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité*. *J. Phys. Radium*, 1926. **6**.
3. Perrin, F., *La fluorescence des solutions.-Induction moléculaire.-Polarisation et durée d'émission.-Photochimie*. *Ann. Phys.*, 1929. **10**.
4. Perrin, F., *Fluorescence. Durée Élémentaire d'Emission Lumineuse*. 1931, Paris: Hermann.
5. Pesce, A.J., C.G. Rosen, and T.L. Pasby, *Fluorescence Spectroscopy*. 1971, New York: Marcel Bekker.
6. Valeur, B., *Molecular Fluorescence*. 2002: WILEY-VCH.
7. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1983, New York: Plenum Press.
8. Lakowicz, J.R., *Techniques*, in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. 1991, Plenum Press: New York.
9. Lakowicz, J.R., *Principles*, in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. 1991, Plenum Press: New York.
10. Valeur, B., *Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters*, in *Molecular Luminescence Spectroscopy 1993*, John Wiley & Sons. p. 25-84.
11. Janin, J., "Déclin de fluorescence", *Méthodes biophysiques pour l'étude de macromolécules*. 1985, Hermann. p. 169-170.
12. Jameson, D.M. and G.D. Reinhart, *Fluorescent Biomolecules*. 1989, New York: Plenum Press.
13. Georgakoudi, I., et al., *NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes*. *Cancer Res*, 2002. **62**(3): p. 682-7.
14. Kirkpatrick, N.D., et al., *Endogenous fluorescence spectroscopy of cell suspensions for chemopreventive drug monitoring*. *Photochem Photobiol*, 2005. **81**(1): p. 125-34.
15. Lakowicz, J.R., et al., *Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(4): p. 1271-5.
16. Munro, A.W. and M.A. Noble, *Fluorescence analysis of flavoproteins*. *Methods Mol Biol*, 1999. **131**: p. 25-48.
17. Scott, T.G., et al., *Emission properties of NADH. Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH and simplified synthetic models*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1970. **92**: p. 687-695.
18. Wagnieres, G.A., W.M. Star, and B.C. Wilson, *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications*. *Photochem Photobiol*, 1998. **68**(5): p. 603-32.
19. Paras, N., *Introduction to Biophotonics*. 2003: Wiley Inter-Sciences.
20. Owen, D.M., et al., *Optical techniques for imaging membrane lipid microdomains in living cells*. *Semin Cell Dev Biol*, 2007.
21. Lakowicz, J.R., *Protein Fluorescence in Topics in Fluorescence Spectroscopy*. 2000, Plenum Press: New York.
22. Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien, *A guide to choosing fluorescent proteins*. *Nat Methods*, 2005. **2**(12): p. 905-9.
23. Hof, M., R. Hutterer, and V. Fidler, *Fluorescence Spectroscopy in Biology*. Springer series on fluorescence. 2005: Wolfbeis OS.
24. Lichtman, J.W. and J.A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. *Nat Methods*, 2005. **2**(12): p. 910-9.
25. Yuste, R., *Fluorescence microscopy today*. *Nat Methods*, 2005. **2**(12): p. 902-4.
26. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. *Nat Methods*, 2005. **2**(12): p. 932-40.
27. Minsky, M., *Microscopy apparatus*. 1957: US Patent 3013467.
28. Minsky, M., *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*. *Scanning*, 1988. **10**: p. 128-138.
29. Petran, M., et al., *Tandem scanning reflected light microscope*. *Scanning*, 1968. **7**: p. 97-108.
30. Kino, G.S., *Intermediate optics in Nipkow disk microscope*, in *Handbook of biological confocal microscopy*. 1995, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London. p. 155-165.

31. So, P.T., et al., *Two-photon excitation fluorescence microscopy*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2000. **2**: p. 399-429.
32. Periasamy, A. and A. Diaspro, *Multiphoton microscopy*. *J Biomed Opt*, 2003. **8**(3): p. 327-8.
33. Friedrich, D.M., *Two-Photon Molecular Spectroscopy*. *Journal of Chemical Education*, 1982. **59**(6): p. 472-481.
34. Göpper-Mayer, M., *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. *Ann. Phys.*, 1931. **9**: p. 273-295.
35. Denk, W. and K. Svoboda, *Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick*. *Neuron*, 1997. **18**(3): p. 351-7.
36. Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. *Science*, 1990. **248**(4951): p. 73-6.
37. Denk, W., D.W. Piston, and W.W. Webb, *Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy*. *Handbook of Biological Confocal Microscopy 2nd Ed.* 1995, New-York: Plenum Press.
38. Denk, W., *Two-photon scanning photochemical microscopy: mapping ligand-gated ion channel distributions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(14): p. 6629-33.
39. A. Fischer, C. Cremer, and E.H.K. Stelzer, *Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a titanium-sapphire laser*. *Appl. Opt.*, 1995. **34**(12): p. 218-226.
40. Xu, C. and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross-sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. *Journal of Optical Society of America B* 1996. **13**(3): p. 481-491.
41. König, K., U. Simon, and K.J. Halhuber, *3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope*. *Cellular and Molecular Biology*, 1996. **42**: p. 1181-1194.
42. Brakenhoff, G.J., M. Müller, and R.I. Ghauharali, *Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects*. *Journal of Microscopy*, 1996. **183**: p. 140-144.
43. Theer, P., M.T. Hasan, and W. Denk, *Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier*. *Opt Lett*, 2003. **28**(12): p. 1022-4.
44. Buehler, C., et al., *Innovations in two-photon deep tissue microscopy*. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 1999. **18**(5): p. 23-30.
45. Beaurepaire, E., M. Oheim, and J. Mertz, *Ultra-deep two-photon fluorescence excitation in turbid media*. *Opt. Comm.*, 2001. **188**: p. 25-29.
46. Schonle, A. and S.W. Hell, *Heating by absorption in the focus of an objective lens*. *Optics Letter*, 1998. **23**: p. 325-327.
47. Cianci, G.C., J. Wu, and K.M. Berland, *Saturation modified point spread functions in two-photon microscopy*. *Microscopy research and technique*, 2004. **64**: p. 135-141.
48. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(11): p. 1369-77.
49. Ragan, T.M., H. Huang, and P.T. So, *In vivo and ex vivo tissue applications of two-photon microscopy*. *Methods Enzymol*, 2003. **361**: p. 481-505.
50. Patterson, G.H. and D.W. Piston, *Photobleaching in two-photon excitation microscopy*. *Biophys J*, 2000. **78**(4): p. 2159-62.
51. Navarro, F.A., et al., *Two-photon confocal microscopy: a nondestructive method for studying wound healing*. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **114**(1): p. 121-8.
52. Schoutteten, L., et al., *Photophysics of Calcium Green 1 invitro and in live cells*. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1999. **1**(10): p. 2463 - 2469.
53. Schoutteten, L., et al., *Development of intracellular calcium measurement by time-resolved photon-counting fluorescence*. *Photochem Photobiol*, 1999. **70**(5): p. 701-9.
54. Koester, H.J., et al., *Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage*. *Biophys J*, 1999. **77**(4): p. 2226-36.
55. French, T., et al., *Fluorescence lifetime imaging techniques for microscopy*, in *Methods of Cells Biology*, Academic Press, 1998. p. 277-287.
56. Guiot, E., *Microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons : applications à des études de corrélations et de déclins de fluorescence en milieu biologique*. 2001, Université Paris XI: Orsay.

57. So, P.T., et al., *New time-resolved techniques in two-photon microscopy*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1998. **44**(5): p. 771-93.
58. Konig, K., et al., *Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress*. J Microsc, 1996. **183**(Pt 3): p. 197-204.
59. Hungerford, G. and D.J.S. Birch, *Single-photon timing detectors for fluorescence lifetime spectroscopy*. Meas. Sci. Technol., 1996. **7**: p. 121-135.
60. O'Connor, D.V. and D. Phillips, *Time-Correlated Single Photon Counting*. 1984: Academic Press.
61. Volkmer, A., et al., *One- and two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins*. Biophys J, 2000. **78**(3): p. 1589-98.
62. Draajer, A., R. Sanders, and H.C. Gerritsen, *Fluorescence lifetime imaging, a new tool in confocal microscopy*, in *Handbook of biological confocal microscopy*. 1995, J.B. Pawley, Ed Plenum Press New York and London. p. 491-505.
63. Vroom, J.M., et al., *Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(8): p. 3502-11.
64. Philip, J. and K. Carlsson, *Theoretical investigation of the signal-to-noise ratio in fluorescence lifetime imaging*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2003. **20**(2): p. 368-79.
65. Suhling, K., P.M. French, and D. Phillips, *Time-resolved fluorescence microscopy*. Photochem Photobiol Sci, 2005. **4**(1): p. 13-22.
66. S. Lindek, E.H.K. Stelzer, and S.W. Hell, *Two-new high resolution confocal fluorescence microscopies (4Pi, Theta) with one- and two-photon excitation*, in *Handbook of biological confocal microscopy*. 1995, Ed Plenum Press New York and London; J.B. Pawley. p. 417-430.
67. S.W. Hell and E. H. K. Stelzer, *Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation*. Opt. Comm., 1992. **93**: p. 277-282.
68. Sandeau, N., *4Pi-microscopie : Applications à la localisation axiale de luminophores et à l'amélioration de la résolution latérale*. 2005, Docteur en Sciences de l'Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Faculté des Sciences et Techniques.
69. O.Haeberlé, *Du Microscope au Nanoscope ? Développements récents en microscopie optique 3D*, in *Colloque SFμ-2007 Grenoble*.
70. Hell, S.W., *Toward fluorescence nanoscopy*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 1347-55.
71. Klar, T.A., E. Engel, and S.W. Hell, *Breaking Abbe's diffraction resolution limit in fluorescence microscopy with stimulated emission depletion beams of various shapes*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2001. **64**(6 Pt 2): p. 066613.
72. Willig, K.I., et al., *STED microscopy with continuous wave beams*. Nat Methods, 2007. **4**(11): p. 915-8.
73. Axelrod, D., *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology*. Traffic, 2001. **2**: p. 764-774.

PARTIE I. MISE EN PLACE ET OPTIMISATION D'UN SYSTEME DE MICROSCOPIE MULTIPONTS SOUS EXCITATION A DEUX PHOTONS

I.1.	Introduction.....	25
I.2.	Optimisation du microscope multiphotons multipoints (MMM).....	28
I.2.1.	Les éléments constitutifs du dispositif.....	28
I.2.1.1.	<i>Le système optique d'excitation multipoints</i>	<i>28</i>
I.2.1.2.	<i>Le système de détection</i>	<i>33</i>
I.2.1.3.	<i>L'interface pilotage/traitement.....</i>	<i>36</i>
I.2.2.	Les performances	39
I.2.2.1.	<i>Résolution axiale et latérale</i>	<i>39</i>
I.2.2.2.	<i>Influence des paramètres d'excitation et de détection sur le signal de fluorescence</i>	<i>42</i>
I.2.3.	Les limitations et les solutions technologiques potentielles	43
I.3.	L'imagerie de fluorescence 4D (x, y, z, t)	45
I.3.1.	Des premiers essais sur des billes fluorescentes... ..	45
I.3.2.	...vers les premiers échantillons biologiques	46
I.3.2.1.	<i>Echantillons cellulaires fixés.....</i>	<i>46</i>
I.3.2.2.	<i>Etude d'un photosensibilisateur en milieu cellulaire.....</i>	<i>50</i>
I.3.2.2.1.	<i>Mode d'action des photosensibilisateurs</i>	<i>51</i>
I.3.2.2.2.	<i>Le PPME : état des connaissances.....</i>	<i>52</i>
I.3.2.2.3.	<i>Propriétés photophysiques du PPME libre et solubilisé dans des liposomes</i>	<i>53</i>
I.3.2.2.4.	<i>Etude en milieu cellulaire : Imagerie résolue en temps par MMM</i>	<i>55</i>
I.3.2.2.5.	<i>Interprétations.....</i>	<i>59</i>
I.4.	Conclusion.....	61
	Annexe A : Matériels et Méthodes	65
	Références.....	69

1.1. Introduction

Depuis environ 15 ans, les différents développements en biophotonique ont permis incontestablement d'améliorer les techniques de microscopie de fluorescence. De nouvelles instrumentations sont apparues telles la microscopie confocale et la microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons. Ces technologies ont augmenté significativement la résolution spatiale de l'imagerie 3D résolue ou non spectralement et/ou temporellement par rapport à la microscopie plein champ. L'inconvénient majeur de ces techniques est qu'il est nécessaire, pour réaliser l'image de tout un échantillon, de disposer d'un système de balayage du faisceau laser ou de déplacement de la platine du microscope qui ne permet pas d'avoir un temps d'acquisition aussi performant qu'en microscopie plein champ.

Il semblait donc intéressant de développer un dispositif optique capable d'augmenter la vitesse d'acquisition des images de fluorescence (idéalement, il faudrait pouvoir se rapprocher du temps d'acquisition d'une image en microscopie plein champ) tout en gardant la résolution spatiale offerte par les systèmes confocaux et biphotoniques.

Un tel développement est également approprié pour l'imagerie 3D résolue temporellement. Il serait alors possible de limiter la dégradation des milieux biologiques due à un temps d'irradiation prolongé [1].

Différentes méthodes utilisant une excitation monopoint ont été mises en place afin d'obtenir des techniques de microscopie de plus en plus rapides, comme l'utilisation de miroirs polygonaux [2] ou de déflecteurs acousto-optiques [3-5]. Cette dernière technique a été plus approfondie que les miroirs polygonaux ; cependant l'interaction acousto-optique engendre une dispersion spatiale et temporelle du paquet d'onde ce qui nuit au rapport signal sur bruit et à la résolution axiale.

La solution la plus attractive est d'opter pour le développement de dispositifs permettant d'augmenter le nombre de points d'excitation, puisque dans ce cas, la vitesse d'acquisition augmentera proportionnellement au nombre de points d'excitation.

Les dispositifs utilisant cette approche sont appelés microscopes multipoints. Ces différents systèmes ayant été optimisés pour travailler sous excitation à deux photons, on parle, dans ce cas, de microscopie multiphotons multipoints ou MMM. Ces dispositifs ont également été implantés dans des systèmes de microscopie de génération de seconde harmonique [6], de microscopie 4Pi [7] et dans des systèmes confocaux [8, 9].

Deux approches sont possibles pour créer une matrice de faisceaux d'excitation : soit en divisant le front d'onde de l'impulsion, soit en divisant son amplitude.

Etat de l'art des dispositifs existants

Le premier système a été mis en place par Bewersdorf et al (1998). Il s'agit d'un système de microlentilles permettant de diviser le front d'onde d'une impulsion laser en 25 faisceaux d'excitation et de balayer l'échantillon par rotation du disque [10] (schéma présenté dans le Tableau I.1-1 A). Brièvement, le support de microlentilles est éclairé par un faisceau laser élargi et collimaté pour créer le réseau de faisceaux d'excitation. Cette technique conduit à une faible transmission du faisceau initial (soit environ 25% de la lumière) et à une inhomogénéité entre les différents points d'excitation notamment pour les points situés sur les bords du disque de microlentilles. Cette inhomogénéité du champ d'excitation et la faible transmission du système optique peuvent être particulièrement gênantes. En effet, il a été démontré que si on bloque 70% de la puissance du laser il en résulte une baisse de l'efficacité à l'excitation de 50% [11].

L'autre inconvénient majeur de la technique est dû aux phénomènes de superposition des faisceaux à l'excitation, en dehors du plan focal. Ce problème peut être compensé soit en décalant chaque faisceau temporellement [12], soit en combinant des lentilles asphériques ou en mettant en place un arrangement de lentilles sphériques afocales [13].

L'avantage majeur de cette technique réside généralement dans le fait qu'elle est associée à un « spinning » disque ce qui évite d'avoir des temps morts au niveau du balayage des faisceaux excitateurs sur l'échantillon.

D'autres types de systèmes générant un réseau de faisceaux d'excitation ont été développés : Buist et al (1998) ont notamment utilisé un réseau rectangulaire de microlentilles avec un balayage des points d'excitation supporté par des miroirs galvanométriques [14]. Des dispositifs utilisant des éléments diffractifs ont également été proposé [15].

Au lieu de morceler le profil du faisceau, on peut envisager de diviser son intensité en plusieurs sous faisceaux. Différentes techniques sont possibles en utilisant soit un « étalon » [16], soit des lames séparatrices agencées en cascade (Tableau I.1-1 B) ou bien une lame séparatrice entourée de quatre miroirs [17-20]. Diviser l'intensité du faisceau présente l'avantage de disposer d'un système flexible pour lequel les faisceaux excitateurs conservent le profil du faisceau d'origine et le champ d'excitation est relativement bien homogène. De plus, comme chacun des sous faisceaux parcourt un chemin optique différent, cela induit intrinsèquement un retard entre chacun d'entre eux et réduit considérablement les effets de « superposition ». Malheureusement, aucun de ces dispositifs n'est compatible avec le système de spinning disque. Le déplacement des faisceaux doit alors s'effectuer avec des miroirs galvanométriques qui limitent la vitesse d'acquisition. Les principaux avantages et inconvénients de ces deux méthodes sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	Méthode de division du front d'onde	Méthode de division de l'amplitude
Transmission	- - Seulement 25% de l'intensité lumineuse est transmise par le système	++ 90% de l'intensité est transmise
Homogénéité du champ	- Inhomogénéité du champ d'excitation surtout pour les faisceaux en périphérie	++ Amplitude équivalente d'un faisceau à l'autre
Vitesse de balayage	++ Utilisation du spinning disque qui permet d'atteindre des vitesses > 1000 images/s	- - Limitée par le déplacement de miroirs galvanométriques
« Crosstalk »	- - Superposition des faisceaux à l'excitation et à la détection	- Superposition des faisceaux seulement à la détection
Utilisation	+ Facile à ajuster	- Ajustement optique délicat mais une fois optimisé, l'ensemble est stable + Conservation du profil d'origine + Flexible
	<p>A.</p>	<p>B.</p>

Tableau I.1-1: Avantages et inconvénients des deux méthodes permettant de diviser le faisceau incident : A. Schéma d'un disque de microlentilles, B. Principe de la cascade de lames séparatrices

Actuellement, il existe une solution commerciale basée sur une version améliorée du système de Nielsen et al. (2001) [20] qui produit une ligne de 64 points d'excitation balayée sur l'échantillon dans les deux directions par des miroirs galvanométriques (La Vision Biotec, Bielefeld, Allemagne).

La Figure I.1-1 résume les différentes solutions technologiques existantes pour générer un réseau de points d'excitation:

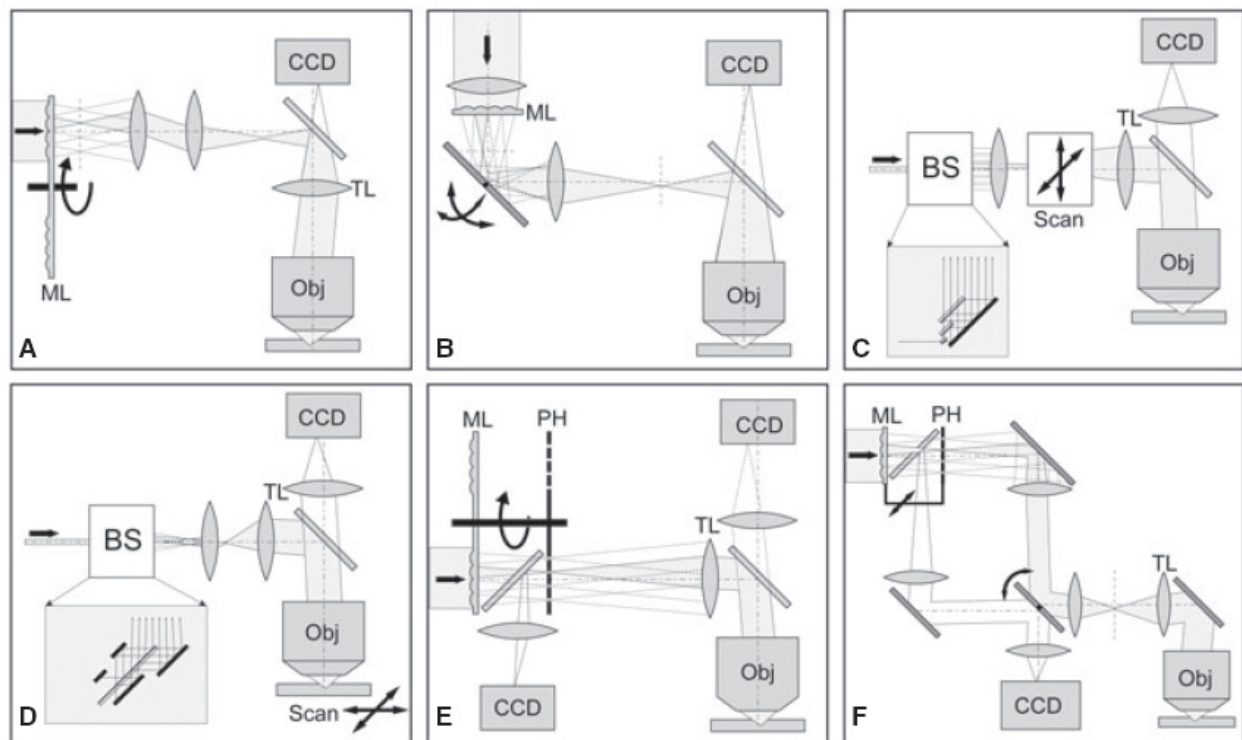


Figure I.1-1 : Les différents dispositifs de microscopie multipoints : A. Disque de microlentilles (25 points d'excitation, Bewersdorf et al. 1998 [10]) B. Arrangement rectangulaire de microlentilles avec disque de Nipkow (40 points d'excitation, Buist et al. 1998 [14]) C. Cascade de lames séparatrices couplée à des miroirs galvanométriques (8 points d'excitation, Fittinghoff et Squier 2000 [16]) D. Ensemble optique comprenant une lame séparatrice et des miroirs (de 8 à 64 points, Nielsen et al 2001 [20], Levêque-Fort et al. 2004 [19, 20]) E. Microlentilles combinées à un système de trous de filtrage (Fujita et al 2000 [21]) F. Disque de microlentilles, comparaison entre une excitation à un photon et une excitation biphotonique (Egner et al. 2002 [7]) ; tableau extrait de l'article de Bewersdorf et al. [11]

Ces différents systèmes peuvent être intégrés dans des montages permettant de faire de l'imagerie de fluorescence 3D résolue ou non temporellement (FLIM : [19, 22-25]) ou de l'imagerie FLIM résolue spectralement [22]. Dans ce cas, des détecteurs résolus spatialement et/ou temporellement, comme une caméra CCD couplée ou non à un amplificateur de brillance résolu en temps (système appelé caméra/porte-temporelle) ou une streak caméra, sont nécessaires pour détecter le signal de fluorescence. On peut ainsi aisément envisager d'effectuer des études sur cellules vivantes : c'est le cas de Straub et Hell qui ont utilisé un système de microlentilles [26].

Enfin, plus récemment, de nouveaux dispositifs utilisant des barrettes de photomultiplicateurs ou des tubes multianodes [23, 25] ont vu le jour (ils seront présentés plus en détail dans la conclusion de cette partie).

Dans notre cas, nous avons choisi de développer un système MMM utilisant un dispositif optique dérivé du travail de Nielsen. Les premiers résultats ont été obtenus au laboratoire avec un système générant une ligne de huit points d'excitation [19]. Dans ce travail de thèse, nous avons étendu le concept en générant une matrice de 64 points d'excitation.

I.2. Optimisation du microscope multiphotons multipoints (MMM)

La microscopie biphotonique multipoints bénéficie des mêmes avantages que l'excitation biphotonique monopoint : confinement de l'excitation au niveau de l'échantillon, séparation aisée de l'excitation et de l'émission et réduction des photodommages induits au sein de l'échantillon.

Le système présenté ici est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Photophysique Moléculaire (LPPM) et du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique avec P. Georges et G. Roger. La conception a été effectuée entre les deux laboratoires et le montage a été réalisé au LPPM. Ce nouveau dispositif permet l'acquisition d'images 3D résolues temporellement.

Avant de présenter les différents atouts de ce système et les premières applications biomédicales réalisées dans le cadre de cette thèse, nous allons détailler le dispositif expérimental.

I.2.1. Les éléments constitutifs du dispositif

I.2.1.1. Le système optique d'excitation multipoints

Construction de la matrice

Notre système est basé sur les travaux de Nielsen [20] qui, comme décrit précédemment, a développé un dispositif permettant de séparer l'amplitude du laser à l'aide d'un ensemble comportant une lame séparatrice 50/50 et des miroirs de part et d'autre. Un premier système optique générant une ligne de huit points d'excitation a été développé [19] au sein de l'équipe, antérieurement à ma thèse. Un gain en temps d'acquisition pouvait encore être réalisé si un deuxième système optique était ajouté en série. Nous obtenons ainsi une matrice d'excitation 8x8. Chaque système (appelé système diviseur) est composé d'une lame séparatrice 50/50, traitée spécifiquement pour être la plus compatible possible avec les impulsions femtosecondes du laser IR accordable (suprasil $\lambda/10$, 60x40x2 mm³, polarisée P, largeur de la bande spectrale 750 - 850 nm (courbes de réponses données en Annexe A 1, p.65)) et de quatre miroirs avec un fort pouvoir réfléchissant.

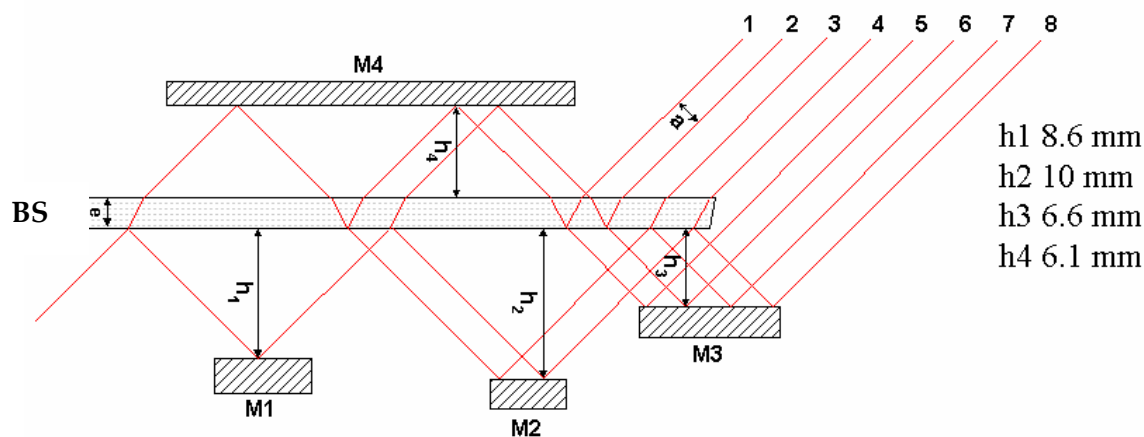


Figure I.2-1 : Schéma représentant l'agencement des miroirs (M1-M4) de part et d'autre de la lame séparatrice (BS) d'épaisseur $a = 2$ mm ; dans cette configuration les faisceaux sortent parallèles entre eux

Le faisceau laser arrive avec un angle de 45° sur la lame séparatrice. Il est séparé une première fois par la lame séparatrice en deux faisceaux (Figure I.2-1). Chacun des faisceaux est réfléchi par un des miroirs M1 et M4 (Figure I.2-1) pour être à nouveau dirigé vers la lame séparatrice. Après une série de réflexions et de transmissions sur l'ensemble des quatre miroirs et de la lame séparatrice, une ligne de huit points d'excitation est créée. Pour pouvoir être à nouveau divisée, cette ligne doit être transposée pour entrer verticalement dans le deuxième système optique. La rotation de la ligne est effectuée par un périscope placé entre les deux dispositifs (Figure I.2-2 A.).

Comme les deux lames sont traitées pour une polarisation P, un polariseur (large spectre 700 – 1000 nm) est placé juste à l'entrée du deuxième montage optique qui est orienté à 90° par rapport au premier (non représenté sur la Figure I.2-2).

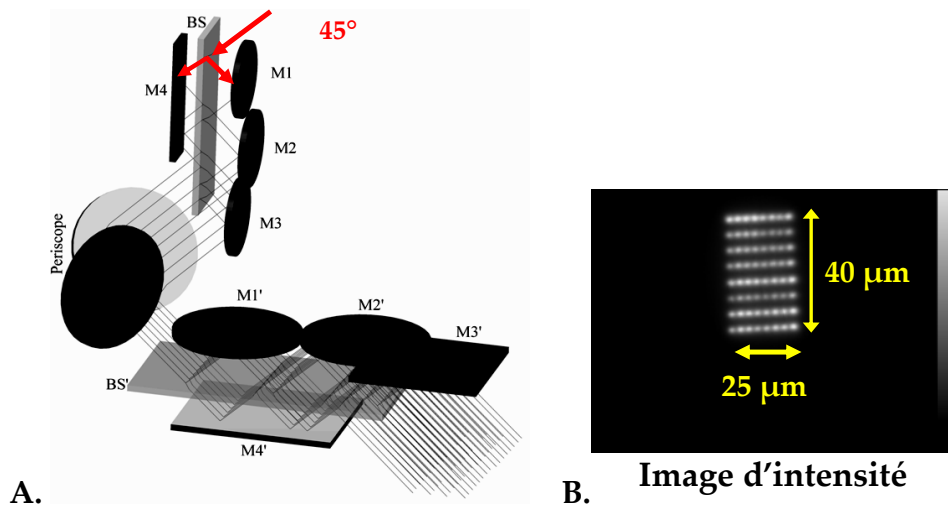


Figure I.2-2 : A. Dispositif optique générant la matrice de 64 points d'excitation : BS et BS' représentent les lames séparatrices et M1, M1', M2, M2', M3, M3' et M4, M4' les miroirs, B. Image d'intensité de fluorescence obtenue sur une couche mince de fluorescéine avec le système MMM couplé au système de détection caméra-HRI.

La géométrie adoptée impose un retard de quelques picosecondes entre chaque faisceau (chemin optique différent pour chacun) ce qui limite les effets de superposition à l'excitation. La distance entre les 64 points d'excitation peut être ajustée en déplaçant les miroirs M1-M3 et M1'-M3'. Pour nos applications, nous avons réglé notre montage de telle sorte que deux points d'excitation soient séparés de 3 μm sur l'axe x et de 5 μm sur l'axe y. La matrice permet d'exciter une surface de 40x25 μm² sur l'échantillon (Figure I.2-2 B.).

Une photo du système complet est présentée sur la Figure I.2-3 :

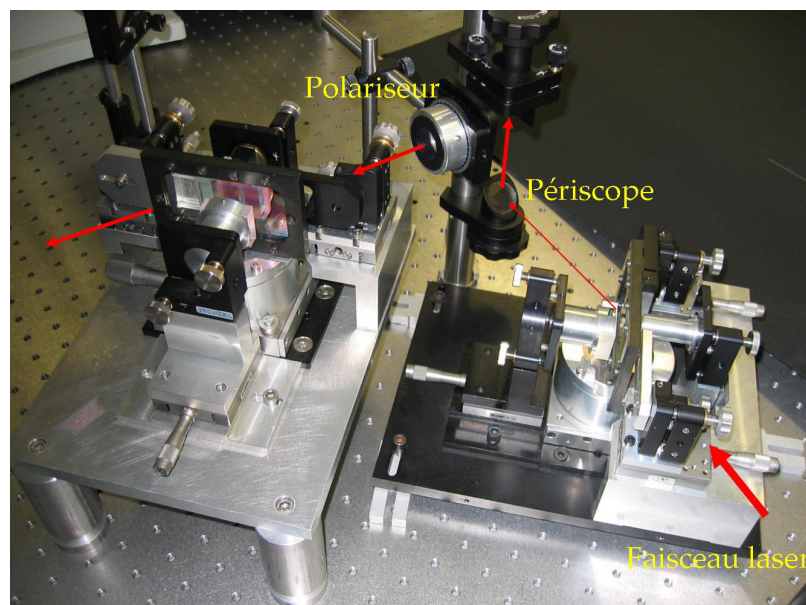


Figure I.2-3 : Vue d'ensemble du montage optique : avec le premier système séparateur générant la ligne de 8 points, le périscope, le polariseur et le deuxième système séparateur

Caractérisation des faisceaux

Une simulation réalisée avec le logiciel Matlab nous a permis de visualiser l'influence des coefficients de transmission et de réflexion des différentes optiques. En effet, même si le traitement des miroirs et de la lame séparatrice a été optimisé, on peut constater sur les courbes de réponse présentées en Annexe A 1 que la lame séparatrice n'est pas exactement 50/50 (oscillation autour de cette valeur, indice de réflexion proche de 0.495) et on observe des pertes au niveau des miroirs ($R = 99\%$). L'ensemble des défauts engendre une perte d'environ 15% de la puissance moyenne du faisceau incident. Ainsi, pour une puissance moyenne du faisceau incident de 700 mW, la puissance moyenne de la matrice de 64 points d'excitation est de 595 mW.

De plus, des différences d'intensité ont été observées entre les différents points d'excitation de la matrice (Figure I.2-4). Néanmoins ces différences n'excèdent pas 20%. Ces inhomogénéités sont dues aux différences de chemins optiques parcourus par les faisceaux (par exemple le faisceau 1 signalé sur la Figure I.2-1 doit traverser 4 fois la lame séparatrice alors que le faisceau 8 ne la traverse jamais).

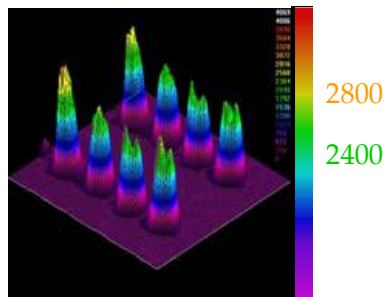


Figure I.2-4 : Profil en intensité des points d'excitation mesuré à la sortie du système diviseur à l'aide d'une caméra CCD Spiricon

Nous insisterons également sur l'importance de la durée des impulsions au point focal de l'objectif car le nombre de photons absorbés et donc le flux de photons fluorescence émis est inversement proportionnel à la durée temporelle de l'impulsion laser. Le phénomène d'absorption à deux photons est optimum pour des impulsions de largeur temporelle comprise entre 100 et 200 fs. Nous avons donc vérifié que l'ensemble du système optique (objectif compris) n'entraînait pas un élargissement temporel trop important de chacun des faisceaux.

Chaque optique du système peut élargir temporellement l'impulsion, ce qui impose une vérification de cette largeur en aval de l'échantillon. L'objectif du microscope est également une source d'élargissement de l'impulsion. Pour des objectifs de large ouverture numérique, plus une impulsion est courte plus elle est élargie temporellement. Il a été ainsi démontré qu'il était plus approprié d'avoir une impulsion proche de 150 fs en sortie du laser pour minimiser l'élargissement temporel du à l'objectif [27]. Dans le cas de notre montage, l'élargissement temporel a été mesuré pour chaque système optique diviseur et pour chaque point (les données sont répertoriées dans le Tableau I.2-1 pour une ligne de huit points et ont été obtenues grâce à un autocorrélateur optique par absorption à deux photons dans une photodiode, mis en place au laboratoire [28]). En moyenne la largeur de l'impulsion à la sortie du système complet est d'environ 190 fs pour chaque point.

	Point 1	Point 2	Point 3	Point 4	Point 5	Point 6	Point 7	Point 8
Δt (fs) (± 3 fs)	188	188	192	186	192	187	190	190

Tableau I.2-1 : Largeur temporelle caractéristique de 8 points de la matrice

Il a également été vérifié qu'une absorption à deux photons était effectivement générée dans le plan focal de l'objectif.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (équation 5, p.11), le flux de photon de fluorescence émis, suite à une excitation biphotonique, est proportionnel au carré du flux de photon incident, lui-même proportionnel à la puissance moyenne du faisceau exciteur (équation 4, p.11).

Par conséquent, il est possible de vérifier que l'on génère bien un processus d'absorption à deux photons au sein de l'échantillon en traçant l'intensité de fluorescence émise en fonction de la puissance moyenne du faisceau incident au carré. Dans ce cas, on doit obtenir une relation linéaire entre les deux grandeurs. Pour tracer cette courbe, nous avons utilisé une monocouche de fluorescéine. D'après la Figure I.2-5, nous obtenons une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence émise par l'échantillon et la puissance moyenne du faisceau incident (on ne tient que d'un seul point d'excitation). Nous générons donc un processus d'absorption à deux photons au sein de l'échantillon. Nous supposons qu'il en sera de même dans tous les autres échantillons étudiés.

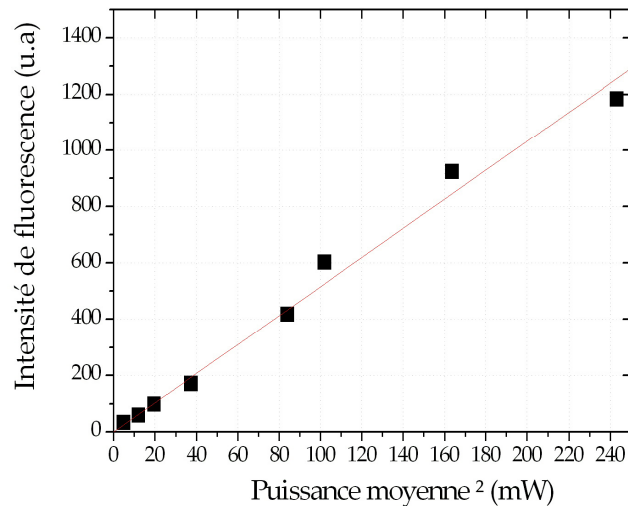


Figure I.2-5 : Vérification du processus d'absorption à deux photons ; Acquisitions réalisées sur une monocouche de fluorescéine avec une puissance moyenne totale mesurée avant l'entrée dans le microscope et rapportée au nombre de points (en supposant qu'idéalement les pertes en intensité sont identiques d'un point à l'autre)

Malgré la complexité apparente du système optique, une fois l'alignement des différentes optiques (système diviseur compris) optimisé, l'ensemble est stable dans le temps, ne nécessite que peu de réglages et son utilisation est plutôt conviviale et peu contraignante. Un réalignement n'est à envisager que lorsque le pointé du laser change et dans ce cas il suffit de réajuster les deux miroirs d'injection placés en amont du système diviseur.

Ce système optique associé à des miroirs galvanométriques (appelés scan laser) est intégré juste à l'entrée du microscope.

Le dispositif complet MMM

La source d'excitation est un laser solide impulsif Titane : saphir fonctionnant en modes bloqués (Mira, Coherent, délivrant des impulsions d'une centaine de femtoseconde à une cadence de 76 MHz, accordable en longueur d'onde pour optimiser l'excitation à deux photons, de 700 à 980 nm) pompé par un laser continu Nd :YAG (YVO₄) (verdi, coherent). La puissance du laser en sortie de cavité est d'environ 1 W mais seuls 700 mW sont utilisés pour notre système MMM (une fraction du faisceau laser est utilisée sur un autre dispositif expérimental).

La source d'excitation est divisée en 64 points d'excitation d'intensité équivalente par le système optique décrit ci-dessus. Les 64 faisceaux disposés sous forme de matrice 8x8 seront envoyés sur l'échantillon via un objectif de large ouverture numérique et la fluorescence collectée en retour est dirigée sur un système de détection résolu spatialement et temporellement. Une fois la matrice de 64 points générée, les miroirs du système optique sont légèrement inclinés pour permettre de focaliser les faisceaux en un seul point sur les miroirs du scan laser.

En effet, la matrice ne couvrant qu'une surface de $40 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ de l'échantillon et de manière non uniforme (Figure I.2-2 B.), nous avons été contraints à utiliser un dispositif de scan laser pour obtenir des images continues du plan focal. La vitesse de fonctionnement du scan laser varie de 50 à 1000 Hz et est ajustée en fonction de l'intensité du signal de fluorescence de l'échantillon.

Les faisceaux sont ensuite envoyés via un télescope sur la pupille arrière de l'objectif ($\times 63$, $\text{NA} = 1,4$, Zeiss plan apochromat à immersion à huile). Pour pouvoir complètement couvrir la pupille de l'objectif, on utilise deux lentilles permettant d'avoir un grandissement transverse $G = 2.66$ (voir Figure I.2-6 pour le schéma du dispositif complet). Un remplissage effectif de la pupille arrière est requis pour que l'objectif soit utilisé dans une configuration où son ouverture numérique est maximale.

Pour le réglage fin de la position en z , l'objectif est monté sur un module de déplacement piézoélectrique (Pifoc Polytech PI). On peut ainsi enregistrer des « piles » d'images à différentes profondeurs dans l'échantillon.

La fluorescence émise en réponse à l'excitation est collectée par le même objectif et est séparée de l'excitation par un miroir dichroïque. Elle est imagée sur l'écran à phosphore de l'amplificateur de brillance à haute cadence (amplificateur de brillance ou HRI ; Kentech Instruments Ltd : 76 MHz, largeur des portes temporelles de 200 à 1000 ps, pas de 25 ps) couplé par l'intermédiaire d'un relais optique à une caméra CCD (12-bits, Hamamatsu, modèle Orca ER en mode binning 2×2). Un filtre IR est ajouté à l'entrée du système de détection pour s'affranchir des éventuels résidus du faisceau excitateur incident. L'amplificateur de brillance possède une résolution spatiale moins bonne que la caméra CCD. Par conséquent, on peut insérer juste avant l'entrée du HRI un télescope, en fonction de la résolution et du champ d'observation requis.

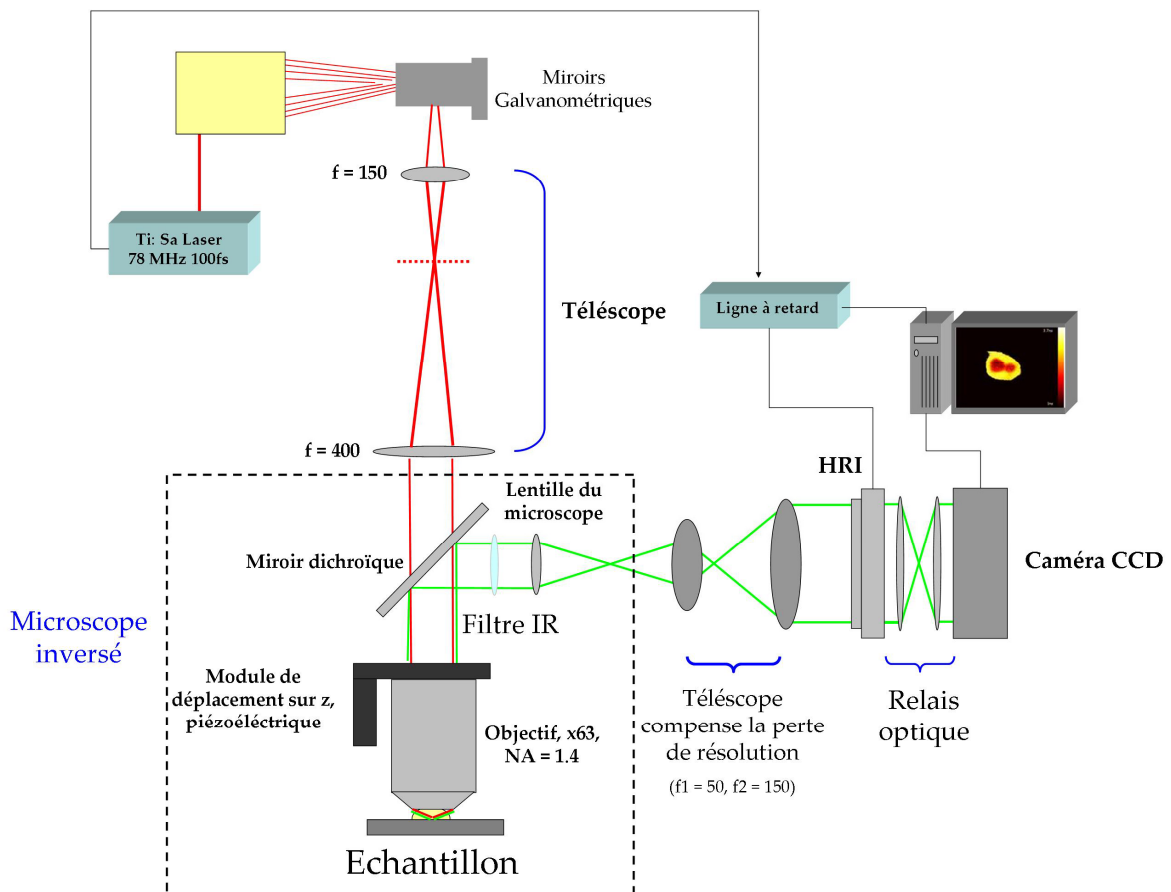


Figure I.2-6 : Schéma du dispositif expérimental de microscopie de fluorescence par excitation multipoints avec le système de détection résolu spatialement et temporellement

Nous avons vu que le dispositif optique séparateur n'engendrait qu'une perte d'environ 15% de la puissance incidente du faisceau laser. On s'attend donc à obtenir pour chaque faisceau une puissance d'environ 10 mW.

En réalité, entre la sortie laser et le port d'entrée du microscope, on perd environ 50% de la puissance laser. Les pertes les plus importantes sont dues aux miroirs galvanométriques. On dispose alors d'une puissance maximale de 5 mW pour chaque faisceau.

I.2.1.2. Le système de détection

L'amplificateur de brillance résolu en temps : HRI (High Rate Imager)

Le HRI est composé d'un amplificateur de brillance d'images à galette de microcanaux (« multichannel plate » ou MCP), d'une photocathode et d'un écran à phosphore. La photocathode reçoit les photons de fluorescence émis par l'échantillon et les convertit en photoélectrons. Le signal des photoélectrons est ensuite amplifié par la galette de microcanaux et envoyé sur l'écran à phosphore. Le potentiel appliqué aux bornes de la MCP (300 V – 900 V) peut être adapté en fonction de l'intensité du signal de fluorescence.

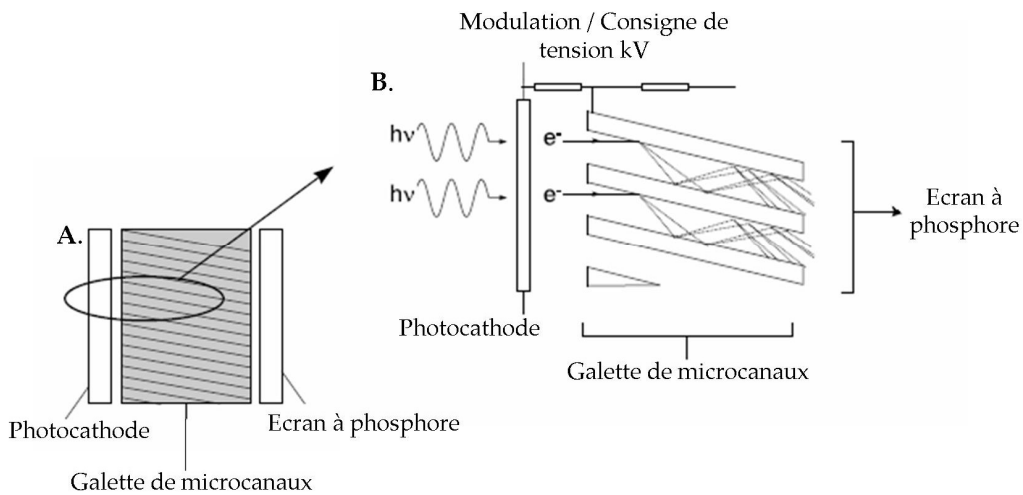


Figure I.2-7 : Schéma de fonctionnement du HRI, [29].

L'écran à phosphore est imagé par la caméra et les données, ainsi acquises, sont transférées à l'ordinateur. La réponse spectrale du HRI est donnée par celle de sa photocathode qui est sensible dans le visible entre 350 nm et 650 nm et dont la réponse spectrale est présentée sur la Figure I.2-8 :

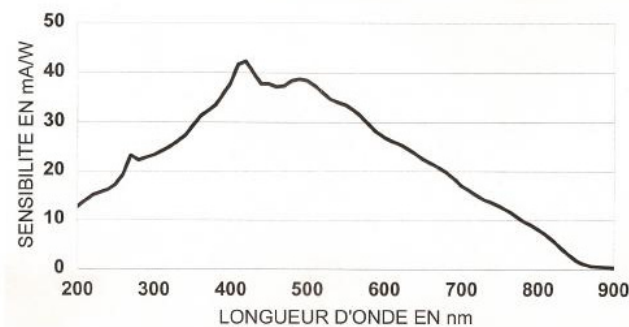


Figure I.2-8 : Réponse spectrale de la photocathode du HRI (d'après les données constructeur).

L'écran à phosphore, qui reçoit les électrons produits par la photocathode et dont le signal est amplifié par la galette de microcanaux, possède un maximum d'émission à 542 nm (référence constructeur P43, composition $Gd_2O_3:S:Tb$) avec un temps de persistance de 1.2 ms, ce qui impose une prise d'images de la fin du déclin vers son début.

Différents paramètres sont ajustables sur l'amplificateur de brillance : la largeur des portes temporelles (temps pendant lequel il est actif) qui varie de 200 ps à 1 ns et la tension appliquée aux bornes de la galette.

Pour des faibles largeurs de portes (200 à 400 ps), le HRI est activé en appliquant aux bornes de la grille placée devant la photocathode une impulsion haute tension. Dans le cas où les portes sont plus larges quelques volts suffisent pour le déclencher.

La largeur de la plus petite porte, soit environ 200 ps, a été contrôlée en plaçant un miroir dans le plan focal de l'objectif. La réflexion du faisceau (très fortement atténué) par le miroir est envoyée sur le système de détection. Une série d'images pour une largeur de porte de 200 ps est enregistrée toutes les 25 ps. On trace l'intensité du signal reçu sur le système caméra/porte temporelle en fonction du retard. La largeur à mi hauteur de la courbe ainsi obtenue correspond à la largeur effective de la porte de plus petite largeur, soit 220 ps.

La même série d'acquisition a été réalisée pour des portes d'une largeur théorique de 500 ps, 800 ps et de 1000 ps (en consigne). On obtient respectivement 580 ps, 860 ps et 1060 ps.

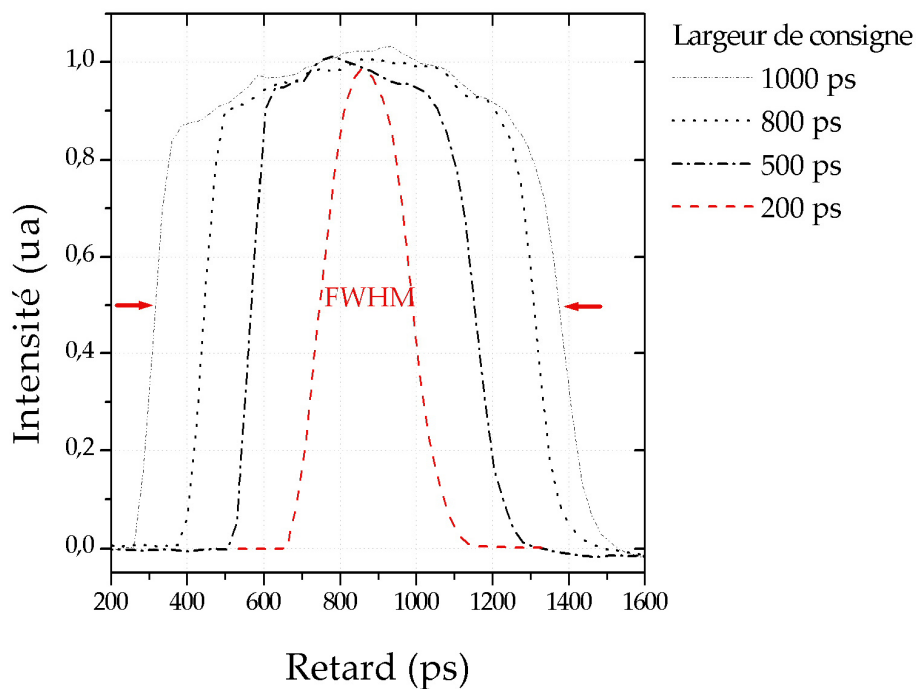


Figure I.2-9 : Détermination expérimentale de la largeur des portes du HRI pour des consignes de 200 ps, 500 ps, 800 ps et 1000 ps

La caméra CCD

La caméra CCD (Orca ER 12 bits, Hamamatsu) possède une surface sensible de $8,67 \times 6,6 \text{ mm}^2$ avec 1024×1344 pixels ce qui donne une taille d'image de 512×672 si on travaille en mode « binning 2x2 » (association des pixels deux à deux). Son gain peut être ajusté et n'influence en rien la résolution spatiale. L'efficacité de la caméra en fonction de la longueur d'onde est donnée sur la Figure I.2-10. On remarque qu'elle perd une partie de son efficacité à partir de 700 nm. Cette réponse spectrale sera importante dans le cas où la caméra est utilisée seule pour enregistrer des images d'intensité de fluorescence. Si elle est couplée à l'amplificateur de brillance, la réponse spectrale de la caméra est limitée par celle de la galette de micro canaux de l'amplificateur de brillance (Figure I.2-8).

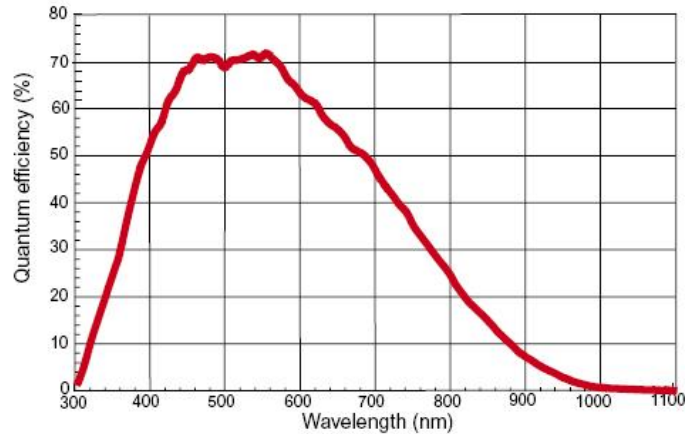


Figure I.2-10 : Efficacité de la caméra Orca ER en fonction de la longueur d'onde

Comme le signal de fluorescence reçu est généralement faible, on moyenne typiquement sur 30 images pour s'affranchir de l'effet granulé provenant de l'écran à phosphore. La caméra est utilisée en mode binning 2x2 pour améliorer le rapport signal sur bruit et la vitesse de transfert des données. On dispose ainsi de « super pixels » qui permettent de diminuer le bruit de lecture. Cependant, on n'associera pas plus de 4 pixels entre eux au risque de dégrader significativement la résolution spatiale.

La taille d'un « super pixel 2x2 » de la caméra, dans notre configuration, a pu être déterminée à l'aide d'une mire. Un pixel ou « super pixel » correspond alors à 0.16 μm .

Pour l'acquisition des images de durée de vie, la caméra CCD est donc couplée au HRI. Cependant, la présence du HRI dégradera la résolution de l'image de fluorescence (ce point est détaillé plus loin).

Dans le cas où l'on veut extraire une information quantitative des images d'intensité de fluorescence, nous avons vérifié que le système de détection complet présentait un fonctionnement linéaire dans notre domaine de travail, qui correspond à un gain sur la MCP compris entre 400 V et 800 V [29].

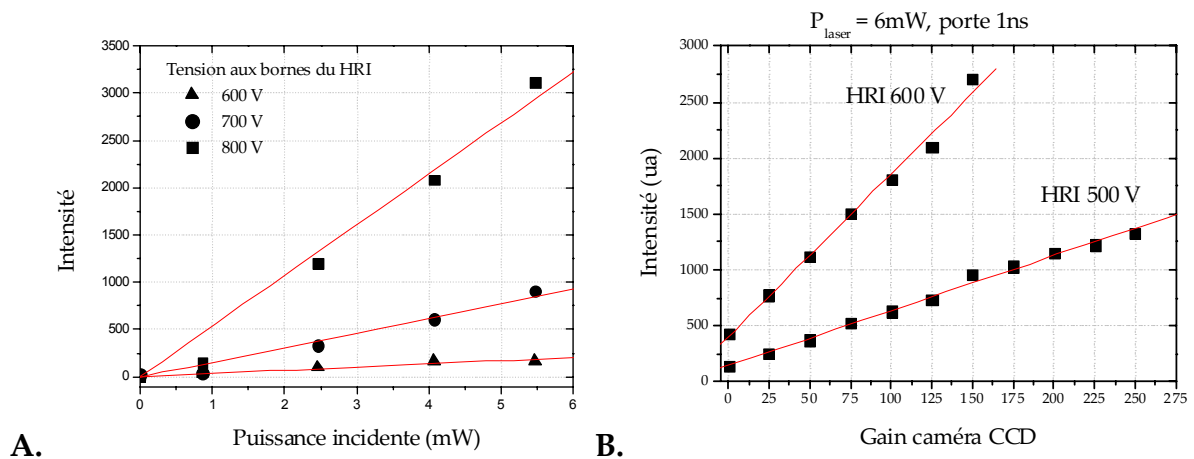


Figure I.2-11 : A. Comportement du HRI en fonction de la puissance incidente, pour trois valeurs de gain sur la MCP, pour un seul point d'excitation, B. Courbe de réponse du système de détection en fonction du gain appliqué à la caméra CCD, $P = 6 \text{ mW}$, ceci pour deux valeurs de gain de la MC : 500 et 600 V. On détecte ici le signal de fluorescence d'une solution de fluorescéine.

Les courbes de la Figure I.2-11 A et B illustrent la linéarité de notre système. La Figure I.2-11 A représente le comportement du HRI en fonction de la puissance moyenne incidente. Pour cela, un seul point d'excitation est utilisé pour lequel on fait varier la puissance moyenne (la puissance est mesurée avant l'entrée du microscope), et c'est la réflexion de ce point sur un miroir placé dans le plan focal de l'objectif du microscope qui est imagée sur le détecteur.

On trace l'intensité de la réflexion en fonction de la puissance moyenne pour plusieurs valeurs de gain sur la MCP du HRI. Quelle que soit la valeur de ce gain, la réponse de l'amplificateur de brillance est linéaire jusqu'à une puissance de 6 mW.

L'influence du gain de la caméra a également été évaluée sur un échantillon de fluorescéine (Figure I.2-11 B). On constate que le comportement du détecteur reste linéaire en fonction du gain de la caméra et que cela reste valable quelle que soit la valeur de gain sur la MCP.

I.2.1.3. L'interface pilotage/traitement

Pour tracer la carte FLIM d'un échantillon, une série d'images d'intensité de fluorescence à différents temps après l'excitation laser est enregistrée. On obtient ainsi, en chaque point de l'image d'intensité de fluorescence totale, un déclin qui est modélisé par une monoexponentielle (voir détail dans le paragraphe traitement des données). La répartition des durées de vie de fluorescence sera représentée en fausse couleur sur une carte de durées de vie. Le procédé d'acquisition est décrit sur la Figure I.2-12 :

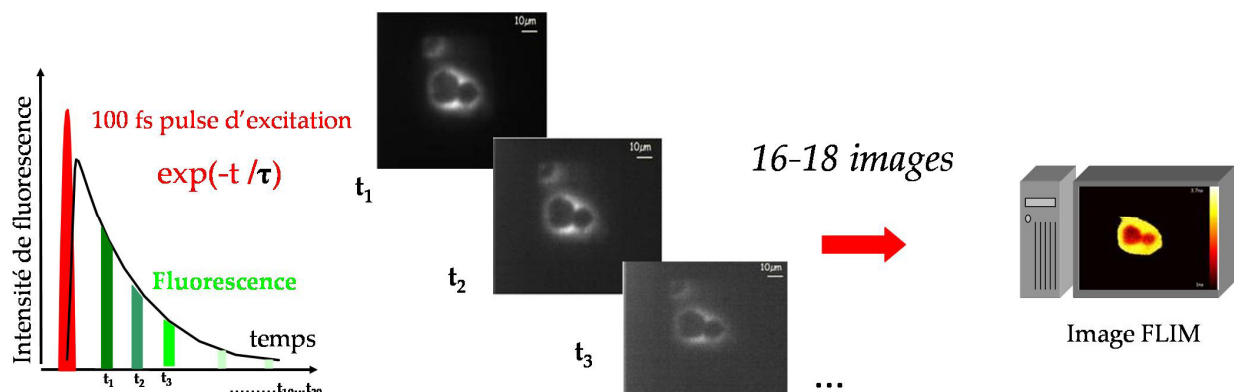


Figure I.2-12 : Méthode d'enregistrement des images FLIM par échantillonnage du déclin de fluorescence

Comme on l'a vu au paragraphe I.1.1.2, les images d'intensité de fluorescence devront être enregistrées en partant de la fin du déclin à cause de la persistance de l'écran à phosphore.

Acquisition des données

Le pilotage du dispositif MMM a été développé avec le logiciel Labview. Le déplacement des miroirs galvanométriques est synchronisé avec la prise d'image, le déplacement du piézoélectrique contrôlant la position sur l'axe z de l'objectif et l'activation du HRI. Enfin l'impulsion laser sert à déclencher l'acquisition.

Les images d'intensité de fluorescence en temps réel et celles moyennées sont affichées simultanément. Le gain et le temps d'intégration de la caméra peuvent être ajustés ainsi que le nombre d'images sur lequel on effectue la moyenne. Lors de l'acquisition des images FLIM, la largeur des portes temporelles et la tension imposée aux bornes de la galette de micro canaux du HRI peuvent être modifiées en fonction de l'intensité du signal de fluorescence émis par l'échantillon.

Pour les mesures FLIM, le déclin de fluorescence est échantillonné. Du point de vue méthodologique, le plus simple est de prendre un espacement temporel constant entre les images. Cependant comme l'information reçue sur le détecteur évolue en exponentielle décroissante, l'échantillonnage du déclin se doit d'être différent entre le début et la fin du déclin ; dans le cas contraire, on observerait un sous-échantillonnage au début du déclin et un sur-échantillonnage à la fin. Une des solutions est d'utiliser un algorithme permettant d'acquérir en début de déclin des portes temporelles rapprochées puis en fin de déclin des portes plus distantes, ce qui revient à échantillonner linéairement l'intensité de fluorescence. Pour cela, on suppose que la durée de vie moyenne de l'échantillon est comprise entre deux valeurs de durée de vie τ_{\min} et τ_{\max} , qui sont à définir pour chaque nouvel échantillon. On définit également un pas en intensité ΔI auquel le nombre de portes temporelles N est inversement proportionnel ($\Delta I = 1/N$).

En prenant τ_{\min} comme durée de vie, pour un déclin monoexponentiel la position temporelle t_i de la i ème porte est donnée par la formule suivante [30] :

$$t_i = -\tau_{\min} \ln(I(t_i)) \quad (1)$$

$$t_i = -\tau_{\min} \ln\left(\frac{N}{N-i}\right) \quad (2)$$

Avec cette formule, on peut ainsi générer la série de points de mesure utilisée lors de l'acquisition. L'échantillonnage ainsi établi est tout à fait adapté à des échantillons pour lesquels la durée de vie de fluorescence mesurée est proche de τ_{\min} . Cependant, si la durée de vie de fluorescence est nettement supérieure, le déclin devra être plus divisé. On est alors contraint de définir une borne supérieure et une borne inférieure pour la durée de vie (τ_{\min} et τ_{\max}) et on applique la formule suivante [30] :

$$t_i = \left(1 - \frac{i}{N} + e^{-\frac{\tau_{\min} \ln N}{\tau_{\max}}}\right)^{-1} \quad (3)$$

Au début du déclin, on opte pour un pas d'échantillonnage le plus petit possible (25 ps) et une fois que l'échantillon est établi, on vérifie qu'il ne présente pas de valeurs redondantes.

Enfin, avant l'acquisition, on définit l'instant de déclenchement de l'amplificateur de brillance noté N. Précisons que ce repère temporel de la première porte correspond au temps mis par les faisceaux d'excitation pour traverser l'ensemble des optiques et il prend également en compte le décalage de l'électronique (soit au total environ 3.9 ns). En conclusion, 16-18 images sont enregistrées en moyenne, ce qui permet d'avoir une bonne précision sur les mesures de durée de vie.

Miroirs galvanométriques

Le déplacement des miroirs galvanométriques (ou scan) est essentiel pour l'acquisition des données de fluorescence. C'est un paramètre expérimental déterminant qui permet notamment de faire varier le temps d'exposition de l'échantillon à l'excitation laser. Au cours des acquisitions, l'image à un temps donné est enregistrée une fois le déplacement du scan terminé.

Le déplacement choisi pour nos acquisitions est un mouvement linéaire avec un pas régulier en x-y de 1 μm . Cette stratégie est la plus simple à mettre en œuvre et la plus couramment utilisée. Cependant, il faut préciser qu'avec un déplacement de ce type, certains points de l'échantillon sont plusieurs fois illuminés, laissant éventuellement apparaître des points de surillumination. Quoiqu'il en soit, il s'est avéré que, sur des échantillons de fluorescéine en solution, nous obtenions une bonne homogénéité et une bonne répartition de l'intensité de fluorescence.

Il faut également tenir compte de la réponse des moteurs des miroirs à la rampe de consigne. En effet, on observe, lors du pilotage des moteurs, une phase d'accélération et de décélération (en début et en fin de consigne et lors des changements de direction). Pour remédier à cet inconvénient, on balaie un champ d'observation sur l'échantillon le plus large possible ce qui permet de ne pas affecter la zone d'intérêt par les effets de bords.

Traitement des données

Le traitement des données finalement enregistrées avec le montage s'effectue de la manière suivante : pour la détermination des durées de vie moyenne en temps réel, on définit sur la première image d'intensité un seuil, choisi de telle sorte qu'il permet d'exclure au maximum le bruit de fond. Les pixels dont l'intensité est au-dessous du seuil seront alors associés à une durée de vie nulle. Bien que ce procédé soit plutôt subjectif, il permet de s'affranchir des pixels comportant un signal de fluorescence trop faible, qui sont difficiles à traiter et qui pourraient conduire à des déterminations erronées des durées de vie de fluorescence.

On peut éventuellement envisager une solution plus objective qui consiste à moduler la carte des durées de vie avec l'image d'intensité totale. Ce n'est pas ce qui a été choisi pour notre étude.

Une fois le seuil déterminé, on définit des zones d'intérêt pour le calcul des durées de vie de fluorescence et on peut également forcer l'ajustement pour qu'il revienne à zéro (niveau du bruit de fond) selon les conditions d'acquisition. Comme il a été vu précédemment, cet ajustement, appliqué à chaque pixel, est un modèle monoexponentiel ajusté par la méthode de Levenberg-Marquardt. Le nombre d'itérations est limité à 10000 pour minimiser le χ^2 (qui correspond à la somme du carré des distances entre les points de l'ajustement et les données). Ces paramètres fixés, l'image de durée de vie de fluorescence est calculée et affichée en fausse couleur en même temps que l'image d'intensité de fluorescence totale (représentée en noir et blanc).

Il est également possible d'exporter les déclins bruts pour un traitement a posteriori, par une méthode plus détaillée (type multiexponentielle) et d'exporter la répartition des durées de vie sous forme de diagramme.

Néanmoins, il est tout à fait possible de recourir à d'autres modèles d'ajustements en fonction des objectifs de l'étude entreprise :

Classiquement, la variation du taux de molécules dans l'état excité S_1 est proportionnelle à la population cet état excité :

$$\text{soit } \frac{dN(t)}{dt} = -(k_f + k_{nr})N(t) \quad (4)$$

avec $N(t)$ population de l'état excité à un instant t

k_f constante de désexcitation radiative

k_{nr} constante de désexcitation non radiative

La durée de vie de fluorescence τ_f représente en réalité le temps moyen pendant lequel le fluorophore est dans son état excité (voir introduction),

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_{nr}}.$$

L'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence $I(t)$ suit la fonction suivante :

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + I_\infty \quad (5)$$

avec I_0 l'intensité initiale et I_∞ l'intensité à $t=\infty$ qui permet de tenir compte du bruit de fond et de l'offset de la caméra.

Pour ce modèle, on ne considère qu'une seule espèce avec une seule durée de vie moyenne [31].

D'autres types de modèle sont envisageables :

-un modèle monoexponentiel utilisant la méthode MLE (Maximum Likelihood Estimator, Annexe A 2)

-un modèle multiexponentiel (équation 6) [32]

$$I(t) = \sum_{j=1}^N I_{0j} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_j}} + I_\infty \quad (6)$$

où I_{0j} est l'intensité à $t=0$ du j ème composé et τ_j la durée de vie associée.

-un modèle utilisant la fonction de Kohlrausch-Williams-Watt (équation 7) [33].

$$I(t) = I_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau_{kww}}\right)^{\frac{1}{h}}} + I_\infty \quad (7)$$

où h correspond au facteur d'hétérogénéité (qui est une mesure de la largeur de la courbe de distribution des durées de vie) et τ_{kww} est la constante de temps de la fonction de Kohlrausch-Williams-Watt. Ce modèle donne une distribution continue des durées de vie de fluorescence et est plus approprié aux échantillons hétérogènes comme les tissus.

Nous avons opté pour le modèle monoexponentiel qui offre le temps de traitement le plus court. Cependant, cette méthode présente des limitations pour les déclinés présentant deux ou plusieurs composantes de durée de vie, ainsi que pour des déclinés possédant une composante de durée de vie très courte avec un poids relativement important. Dans ce cas, l'ajustement va essentiellement prendre en compte la composante de durée de vie courte et minimiser le poids de la durée de vie longue. On obtient alors des durées de vie moyennes beaucoup plus courtes qu'attendues ce qui peut fausser l'interprétation des données. Sachant cela, il est nécessaire de vérifier l'allure des déclinés non traités et de refaire un traitement en utilisant un modèle multiexponentiel.

I.2.2. Les performances

La microscopie sous excitation à deux photons permet d'avoir, en temps normal, une bonne résolution dans les trois dimensions : l'excitation étant confinée au point de focalisation, le volume excité est intrinsèquement petit ce que nous devons vérifier sur notre système.

I.2.2.1. Résolution axiale et latérale

PSF (Point Spread Function) à l'excitation

Pour obtenir la PSF à l'excitation des points d'excitation, on place un miroir dans le plan focal de l'objectif et on détecte la réflexion du faisceau laser (à la longueur d'onde 800 nm) sur la caméra CCD. La Figure I.2-13 représente le profil spatial permettant de définir la PSF à l'excitation. Cette fonction est ajustée par une fonction d'Airy et possède une largeur à mi-hauteur de 500 nm. Pour un faisceau couvrant entièrement la pupille d'entrée de l'objectif de large ouverture numérique, le profil d'intensité est approché par une gaussienne [34].

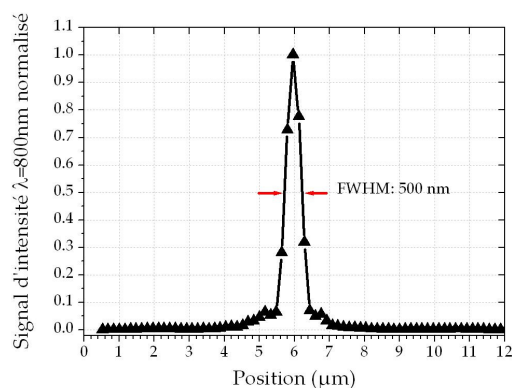


Figure I.2-13 : PSF à l'excitation d'un des points : image de la réflexion par un miroir sur la caméra CCD.

Résolution axiale

Pour notre système MMM, les signaux de fluorescence, émis par les différents points de la matrice d'excitation, sont collectés simultanément par la surface sensible du détecteur caméra/porte-temporelle. Celui-ci intègre l'émission pendant toute la durée du balayage 2D de la matrice d'excitation sur l'échantillon.

La PSF à l'émission détermine la résolution du système MMM latéralement alors que la résolution axiale est déterminée par le produit de la PSF à l'excitation par la PSF à l'émission ce qui explique que la résolution axiale soit sensible aux variations dues à la diffusion des photons dans l'échantillon.

La résolution axiale est déterminée en mesurant la réponse d'une bille fluorescente de 10 μm de diamètre déposée sur une lamelle (Molecular Probes, fluospheres carboxylates modified microspheres). On ajuste la courbe obtenue par une gaussienne [14]. Pour cela, on utilise l'expression analytique suivante $I(z)$:

$$I(z) = \frac{A}{\pi} \left(\frac{\pi}{2} + \arctan\left(\frac{z - z_0}{z_r}\right) + \frac{1}{\frac{z_r}{z - z_0} + \frac{z - z_0}{z_r}} \right)$$

avec z_r la longueur de Rayleigh donnée par $1.169 \times \left(\frac{n\lambda}{ON^2}\right)$,

A le coefficient de normalisation,

z les coordonnées axiales,

z_0 correspond à la position de l'interface entre l'échantillon et la lamelle,

ON l'ouverture numérique,

λ la longueur d'excitation

et n l'indice optique de l'échantillon.

Pour $ON = 1.4$, $n = 1.52$ l'indice du verre et $\lambda = 800$ nm, on obtient une résolution axiale (z_r) théorique d'environ 0.7 μm . Expérimentalement (Figure I.2-14), on trouve une valeur de 1 μm ce qui est peu éloignée de la théorie. On remarque que pour $z > 7$ μm l'intensité ne suit plus tout à fait l'ajustement. Cette déviation est caractéristique de la discontinuité d'indice à l'interface entre la bille et la lamelle [14]

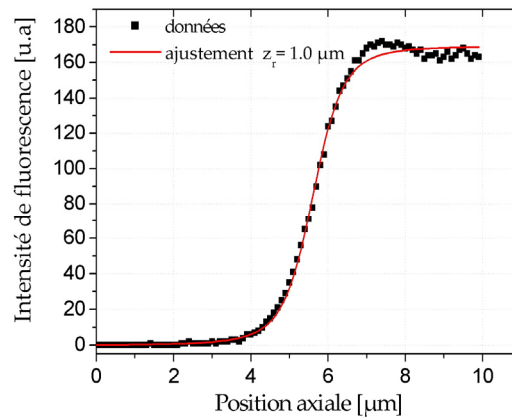


Figure I.2-14 : Début de la gaussienne représentant le profil d'une bille fluorescente de 10 μm de diamètre (détermination de la résolution axiale de notre système).

Résolution latérale

Lorsqu'un faisceau laser est focalisé par une lentille, la taille minimale du point de focalisation est le diamètre de la tâche d'Airy ϕ_{Airy} . La résolution latérale ω_0 correspond à $\phi_{\text{Airy}}/2$ (limité par la diffraction) :

$$\text{Soit } \omega_0 = \frac{0.61 \times \lambda}{ON}$$

Le profil caractéristique a été représenté sur la Figure I.2-15. Il a été tracé en enregistrant l'image d'intensité de fluorescence d'une solution de fluorescéine (matrice d'excitation fixe) sur la caméra CCD (Figure I.2-16 A).

La valeur théorique de la résolution latérale que nous devrions obtenir avec notre dispositif expérimental est de 350 nm ($ON = 1.4$, $\lambda = 800$ nm) ; la valeur mesurée est comprise entre 600 et 700 nm, soit un résultat environ deux fois plus élevé que la valeur théorique. Cette différence peut provenir d'un mauvais remplissage de la pupille d'entrée de l'objectif par le faisceau excitateur (sous remplissage de la pupille arrière). Néanmoins, nous avons gardé cette configuration car tous les points sont quasiment uniformes.

A partir de ces résultats, le volume d'excitation V_{eff} peut être déterminé d'après la formule suivante :

$$V_{eff} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^2 \omega_0^2 \omega_z$$

soit théoriquement $V_{eff} = 0.17 \mu\text{m}^3$ et pour notre montage MMM $V_{eff} = 0.36 \mu\text{m}^3$. On a donc un facteur deux entre la valeur théorique et la valeur expérimentale qui est dû à la résolution latérale de notre dispositif.

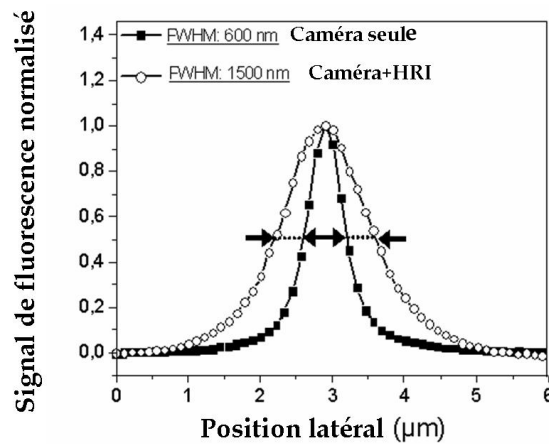


Figure I.2-15 : Résolution latérale obtenue sur une couche mince de fluorescéine en chaque point d'excitation, soit en ne gardant que la caméra CCD pour la détection, soit avec le système complet caméra-porte temporelle.

Lorsque la caméra est couplée avec le HRI, cette résolution est dégradée (Figure I.2-16 B). D'après la Figure I.2-15, la largeur à mi-hauteur du profil d'intensité de fluorescence est alors de 1.5 µm, soit un facteur 2.5 entre les deux configurations. Ceci s'explique par la taille des cellules sensibles du HRI. Nous avons remédié au problème en plaçant en amont du HRI un télescope avec un grandissement de 2.5, 3 ce qui malheureusement limite le champ d'observation.

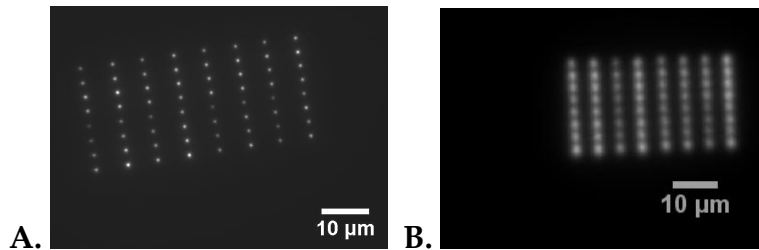


Figure I.2-16 : A. Image de fluorescence d'un échantillon de fluorescéine enregistrée sur la caméra CCD B. Image de fluorescence d'un échantillon de fluorescéine acquise sur la caméra CCD couplée au HRI.

L'objectif du microscope de notre dispositif expérimental offre une excellente résolution spatiale cependant il faut rappeler que de tels objectifs de grande ON offrent des distances de travail et des profondeurs de champs limitées.

I.2.2.2. Influence des paramètres d'excitation et de détection sur le signal de fluorescence

L'exposition prolongée des échantillons au rayonnement laser peut engendrer un effet de photoblanchiment de l'échantillon. Ce phénomène peut influencer l'intensité de fluorescence détectée et dans la configuration de notre système, le photoblanchiment peut avoir un impact sur la durée de vie.

Il a été vu au paragraphe I.2.1.3 qu'à cause de la persistance de l'écran à phosphore, l'acquisition des images s'effectue de l'image d'intensité de fluorescence la plus basse à celle d'intensité la plus élevée. Par conséquent, une diminution de la fluorescence au cours de l'acquisition aura pour conséquence d'allonger artificiellement la durée de vie de fluorescence du fluorophore étudié.

Il est donc essentiel de contrôler la puissance laser et de limiter le temps d'irradiation de l'échantillon afin de minimiser l'effet du photoblanchiment. Dans le cadre des études décrites ci-après, nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales répondant à ces critères.

Certains autres paramètres, s'ils sont mal choisis, peuvent avoir des effets artefactuels sur le signal de fluorescence, comme la vitesse de balayage du scan laser, la largeur des portes temporelles du HRI, le gain caméra ou encore le potentiel électrique appliqué sur la MCP.

A noter que le gain de la caméra n'influencera pas l'acquisition des durées de vie.

Influence du temps d'exposition

Le temps d'exposition de l'échantillon à l'excitation laser est imposé par la vitesse de balayage du scan laser. Typiquement, le temps d'exposition est compris entre 1 ms (1000 Hz) et 30 ms (33.33 Hz). Nous avons regardé l'influence de ce temps d'exposition sur un échantillon homogène (solution de rhodamine B dans l'éthanol). Pour ces mesures, la longueur d'excitation est de 800 nm, la largeur des portes temporelles d'acquisition de 500 ps et le gain sur la caméra et la MCP sont gardés constants. On s'attend à ce qu'une diminution de la vitesse de balayage augmente le rapport SNR puisque la statistique de comptage augmente.

L'objectif étant d'obtenir un temps d'acquisition le plus court possible tout en gardant une bonne résolution, on essaie de trouver un compromis entre la vitesse de balayage la plus rapide possible et un rapport SNR (« signal noise ratio ») le plus élevé.

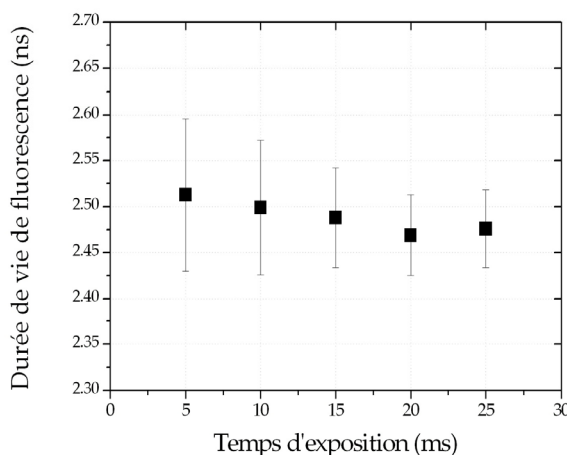


Figure I.2-17 : Impact de la vitesse de balayage sur la durée de vie de fluorescence pour une solution de rhodamine B dans l'éthanol.

D'après la Figure I.2-17, le temps d'exposition de 20 ms est celui qui donne le meilleur rapport SNR. Néanmoins, à la vue des valeurs de durées de vie, la variation observée entre 20 et 10 ms est peu significative.

Par conséquent, pour cet exemple de mesure, il est raisonnable d'envisager un temps d'exposition de 10 ms qui donne des résultats satisfaisants du point de vue des durées de vie et qui permet d'effectuer l'acquisition des images de fluorescence suffisamment rapidement pour limiter les photodommages sur des échantillons cellulaires vivants.

Influence de la largeur des portes temporelles

L'utilisation de portes de largeur temporelle la plus petite possible (soit environ 200 ps) présente l'avantage de ne pas allonger artificiellement la valeur des durées de vie de fluorescence de l'échantillon. Cependant, si l'échantillon présente un faible signal de fluorescence, le taux de comptage de photon pour une largeur de porte de 200 ps est insuffisant. L'augmentation du temps de collection des photons en élargissant les portes temporelles à 500 ps voir 1 ns pourra alors être plus appropriée.

Le réglage de la largeur des portes temporelles dépend également de l'échantillon. En effet, le résultat sera différent si la durée de vie du fluorophore est inférieure ou supérieure à la nanoseconde.

A la vue de la diversité des fluorophores existants, il sera préférable de déterminer une valeur de largeur de porte qui pourra être utilisée quel que soit l'échantillon étudié. En faisant varier, le type d'échantillon et en comparant les durées de vie obtenues avec notre système à celles répertoriées dans la littérature, nous avons opté pour une largeur de 500 ps. Cette largeur se trouve être également le meilleur compromis entre résolution temporelle et résolution spatiale. En effet, si l'augmentation de la largeur des portes temporelles améliore la résolution spatiale, sa diminution quant à elle favorise une meilleure résolution temporelle.

On peut craindre également que la largeur des portes temporelles induise une sous ou une sur évaluation de la durée de vie moyenne. En fait, la largeur des portes peut avoir un impact sur les déclinés présentant plusieurs composantes mais pas sur les déclinés monoexponentiels. En effet, des mesures expérimentales sur des solutions de fluorescéine et de rhodamine B ont montré que la largeur des portes n'avait aucun effet sur la valeur finale des durées de vie moyennes. Ces résultats ont été confirmés par des modélisations.

Remarque : nous avons pu constater que l'augmentation du gain sur la galette de microcanaux pouvait engendrer une légère dégradation de la résolution spatiale, par conséquent nous avons restreint la gamme de travail à 500-700 V.

I.2.3. Les limitations et les solutions technologiques potentielles

Si l'excitation à deux photons permet, dans l'absolu, d'observer plus en profondeur les échantillons biologiques épais, le fait d'utiliser un système de détection résolu spatialement comme une caméra CCD, va au contraire limiter cette profondeur de pénétration. En effet, ce système de détection est plus sensible aux phénomènes de diffusion qu'un système utilisant pour la détection une galette de microcanaux. Notre méthode de détection sera donc idéale pour les milieux peu diffusants tels que les cellules adhérentes sur lame.

L'utilisation d'un système à miroirs galvanométriques pour le balayage de la matrice d'excitation est également problématique. En effet, c'est un système qui s'avère peu rapide et qui impose des temps morts.

Pour gagner en rapidité et pallier au problème de surillumination, une stratégie de déplacement du scan un peu différente, permettant une illumination uniforme de l'échantillon, est envisagée : typiquement, dans la configuration actuelle de la matrice d'excitation, il faut effectuer sur l'axe des x, un déplacement de 1 μm suivi d'un déplacement de 25 μm (soit la largeur de la matrice) et sur l'axe des y, deux déplacements de 1 μm puis un déplacement de 40 μm (Figure I.2-18). Or, ce genre de déplacement est délicat à mettre en place avec le type pilotage utilisé pour notre montage.

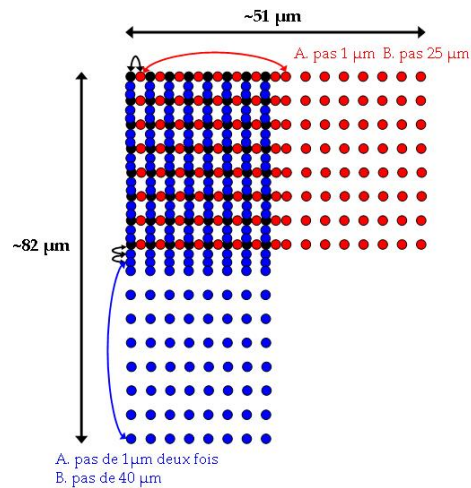


Figure I.2-18 : Déplacement optimum de la matrice pour disposer d'une illumination de l'échantillon homogène

Un autre type de stratégie peut être envisagé pour régler les problèmes de surillumination, en gardant un déplacement par pas de 1 µm du scan laser dans les deux directions x-y : il suffit d'enregistrer l'image d'intensité pour chaque position du scan laser sur l'échantillon [20].

Cette méthode permettrait également de s'affranchir des effets de recouvrement de la fluorescence à la détection lors d'un traitement de l'image. Cependant, elle présente un inconvénient majeur : outre le fait qu'elle nécessite une grande capacité de stockage des données, les outils de traitement de l'image à mettre en place sont particulièrement lourds à développer.

Différentes stratégies commencent à apparaître pour améliorer la vitesse d'acquisition que ce soit avec le disque de microlentilles, en adoptant un déplacement stochastique [35], ou avec le système de lames séparatrices, en supprimant complètement le déplacement sur l'échantillon [18]. D'autres solutions sont également disponibles : par exemple la combinaison d'un miroir polygonal, qui assure le déplacement dans une direction, avec un miroir galvanométrique, pour le déplacement selon l'autre direction [2].

Le type de traitement utilisé dans notre montage, pour l'image des durées de vie, est également une source de limitation pour la vitesse d'acquisition des données. Bien sûr, nous avons réussi à réduire le temps d'acquisition des images FLIM et à enregistrer sur des échantillons biologiques fragiles, des images 3D résolues temporellement, avec une bonne résolution spatiale. Néanmoins, il est tout à fait envisageable d'améliorer encore ce temps d'acquisition en modifiant la stratégie d'acquisition des durées de vie. Un nombre plus restreint de portes pourrait être enregistré dans le cas où un traitement de type RLD (Rapid Lifetime Determination) serait envisagé. Deux ou trois portes seraient suffisantes pour remonter à la valeur de la durée de vie moyenne de fluorescence, ce qui réduirait drastiquement le temps d'acquisition.

Pour une étude où l'on va privilégier la rapidité d'acquisition, on peut envisager d'acquérir seulement 2 images avec des portes temporelles de largeur supérieure à 1 ns. Dans ce cas, un HRI permettant de générer des portes larges de 1 à 5 ns est requis.

La RLD donne en temps réel une solution générale au problème. Le principe de cette méthode est brièvement rappelé :

Généralement les molécules étudiées possèdent une durée de vie de fluorescence de quelques nanosecondes. Pour un déclin monoexponentiel de l'intensité de fluorescence, la durée de vie est donnée par la formule suivante :

$$\tau_{fluor} = \frac{\Delta T}{\ln\left(\frac{I_a}{I_b}\right)}$$

avec ΔT le temps entre deux portes temporelles (peut être égale à la largeur de la porte si on prend deux portes adjacentes)

I_a et I_b les intensités de fluorescence intégrées sous le déclin (voir Figure I.2-19)

On imposera une largeur de portes identique pour les deux images. ΔT sera soit égal à Δt (Δt la largeur de la porte temporelle) soit à $\Delta t/2$. Des études précédemment menées ont démontré que le chevauchement des deux portes donne de meilleurs résultats [36].

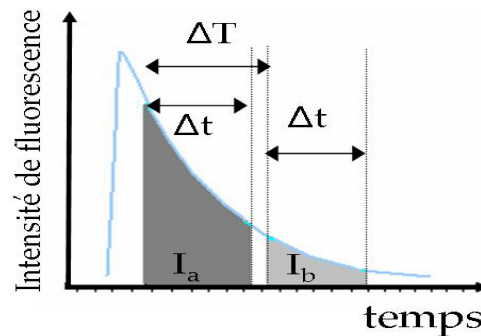


Figure I.2-19 : Principe de l'imagerie FLIM avec acquisition, pour le traitement RLD, de deux portes temporelles de largeur Δt et séparées de ΔT . I_a et I_b intégration de l'intensité sous la courbe.

Cette méthode ne s'appliquera qu'aux signaux intenses et est particulièrement bien adaptée pour de l'imagerie ultra rapide. Néanmoins, elle a ses limites notamment dans le cas de déclin de fluorescence multiexponentiels. Elle est donc inadaptée à une étude fine des durées de vie de fluorescence.

Dans notre cas, comme les durées de vie de fluorescence mesurées peuvent être comprises entre 1 ns et 5 ns, les acquisitions doivent être réalisées avec des portes d'une largeur pouvant aller de 2 à 5 ns. Par conséquent, pour pouvoir réaliser le traitement RLD, la configuration de notre HRI doit être modifiée ainsi que notre interface d'acquisition et de traitement, ce qui est en train d'être réalisé.

I.3. L'imagerie de fluorescence 4D (x, y, z, t)

L'utilisation d'une matrice d'excitation 8x8 et d'un système de détection caméra/porte-temporelle, va nous permettre d'acquérir des images de fluorescence 3D résolues temporellement : imagerie 4D (x, y, z, t). Les différents atouts de notre montage seront présentés d'abord sur des échantillons simples comme des billes en latex fluorescentes ou des grains de pollen, avant d'être utilisés sur des échantillons biologiques plus ou moins robustes. La pertinence d'un tel montage sera démontrée lors de l'étude des propriétés photophysiques d'un photosensibilisateur en milieu cellulaire.

I.3.1. Des premiers essais sur des billes fluorescentes...

Les premières acquisitions ont été réalisées avec des billes de latex de différents diamètres (Molecular Probes : fluospheres carboxylates modified microspheres, red fluorescent; pour les billes de 2 μm de diamètre les longueurs d'onde caractéristiques sont les suivantes : $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$ et pour les billes de 10 μm de diamètre $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$) et incluant différents fluorophores ayant chacun des durées de vie distinctes. Elles sont immobilisées dans un gel d'agarose à 2% et excitées à la longueur d'onde 800 nm. Les images couvrent une surface de 44 μm x60 μm et les déclin sont acquis en utilisant une largeur de porte temporelle de 500 ps.

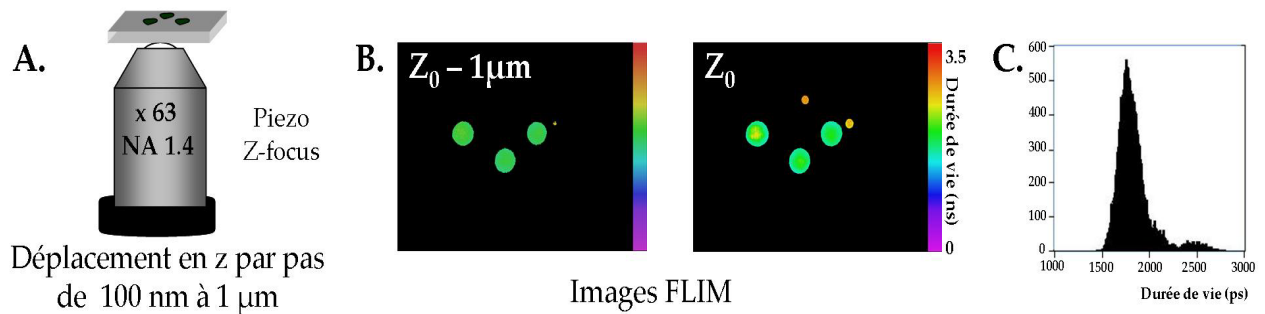


Figure I.3-1 : A. Schéma du module piézoélectrique permettant le déplacement de l'échantillon suivant l'axe z ; B. Images de durée de vie d'un mélange de billes de 2 µm et 10 µm de diamètre dans deux plans différents ; C. Diagramme de répartition des durées de vie mesurées pour l'échantillon de billes.

Plusieurs images 3D résolues temporellement ont pu être réalisées sur ce type d'échantillon en déplaçant le plan focal selon l'axe z, par pas de 0.2 ou 0.5 µm. Nous avons pu constater que d'un plan à l'autre les images d'intensité de fluorescence et de durée de vie étaient homogènes (Figure I.3-1 B.). Les deux types de billes ont des durées de vie de fluorescence différents : les billes de 2 µm ont une durée de vie moyenne de l'ordre de 2.4 ± 0.3 ns et celles de 10 µm ont une durée de vie moyenne de l'ordre de 1.7 ± 0.3 ns. Le diagramme de répartition des durées de vie donné sur la Figure I.3-1 C permet de facilement distinguer ces deux durées de vie. De plus, nous avons déterminé que l'acquisition de l'image 3D d'un objet de 10 µm prend en moyenne 3-4 min, en effectuant un déplacement en z avec un pas de 0.2 µm. Tant du point de vue du temps d'acquisition des images que de la cohérence des résultats obtenus en durée de vie, les premières acquisitions réalisées sur les microbilles sont encourageantes et nous permettent de poursuivre la calibration de notre dispositif MMM sur des échantillons d'intérêt biologique. Pour des études sur du matériel biologique, des pas de 0.5 µm seront plus adaptés du fait de l'épaisseur des spécimens (épaisseur d'une cellule eucaryote de l'ordre de 40 µm).

I.3.2. ...vers les premiers échantillons biologiques

Dans un premier temps, les tests de calibration et de validation de notre système MMM ont été réalisés sur des échantillons biologiques fixés. Ces échantillons sont relativement robustes et ont permis de mettre en évidence les différents avantages de notre dispositif.

I.3.2.1. Échantillons cellulaires fixés

Avantage majeur du système

Les premières acquisitions réalisées sur des échantillons de cytologie urinaires (cellules extraites des urines d'un patient, colorées selon le protocole de coloration de Papanicolaou, fixées et montées dont la préparation sera détaillée dans la partie II) ont permis de mettre en évidence un atout majeur de notre dispositif MMM générant une matrice de 64 faisceaux d'excitation. En effet, il est possible d'acquérir les images de durée de vie de fluorescence d'une cellule sans effectuer de déplacement de la matrice d'excitation sur l'échantillon. Le résultat est illustré sur la Figure I.3-2. Cette caractéristique constitue un sérieux avantage par rapport au système commercial existant (La Vision Biotec, Bielefeld, Allemagne) qui n'utilise qu'une ligne de 64 points d'excitation.

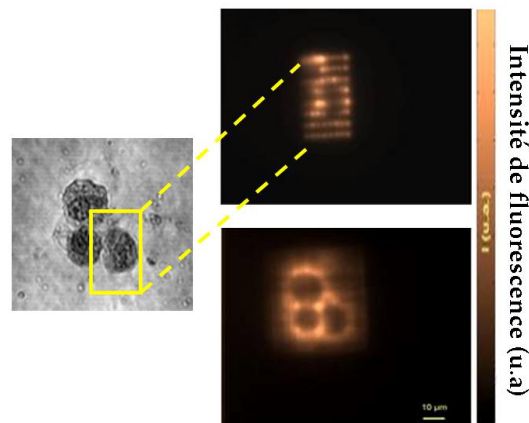


Figure I.3-2 : Images en transmission et de fluorescence de cellules urothéliales tumorales sans (en haut) et avec déplacement (en bas) de la matrice d'excitation ; $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$, paramètres de déplacement de la matrice d'excitation : 20 lignes, 20 colonnes, pas de $1 \mu\text{m}$ et 10 ms par position (100 Hz).

Echantillon test, utilisation de l'accordabilité de la source laser

Les sections efficaces d'absorption à deux photons sont généralement très faibles (typiquement de l'ordre de $10^{-50} \text{ cm}^2/\text{molécule}/\text{photon}$, [37]). Par contre, le spectre d'absorption à deux photons d'une molécule est beaucoup plus large que celui à un photon de la même molécule. On observe également que, pour avoir une absorption biphotonique optimale, la longueur d'onde n'est pas forcément le double de celle qui est maximale en absorption monophotonique.

Compte tenu de ces propriétés d'absorption à deux photons, il est néanmoins possible, en jouant sur l'accordabilité du laser titane : saphir, d'exciter préférentiellement un chromophore par rapport à un autre.

Sur ce principe, les images de durée de vie de différents plans z , à des longueurs d'onde d'excitation différentes, ont été enregistrées sur un échantillon étalon. Il s'agit de cellules d'artères pulmonaires de bœuf, fixées, dont certaines organelles ont été marquées : le noyau est marqué au DAPI ($\lambda_{abs} = 358 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 461 \text{ nm}$ lorsqu'il est lié à l'ADN) et est excité par absorption de deux photons de 780 nm . En temps normal, le maximum d'absorption à deux photons du DAPI est de 700 nm [38]. Malheureusement à cette longueur d'onde nous avons été confronté à un problème de puissance en sortie de la cavité laser et nous n'avons pas pu l'utiliser. Les éléments structurels type filaments d'actine ont été marqués au BODIPY FL phalloïdine ($\lambda_{abs} = 505 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 512 \text{ nm}$) qui est excité à 850 nm [38] et les mitochondries ont été marquées avec un marqueur mitochondrial ($\lambda_{abs} = 579 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 599 \text{ nm}$). Ce dernier absorbera une partie de l'excitation à 850 nm mais avec une section efficace d'absorption très faible.

Les données de la littérature indiquent que le DAPI, intercalé dans l'ADN, a une durée de vie de fluorescence moyenne de 2.8 ns [39]. Ce déclin de fluorescence comporte deux composantes, l'une d'une durée de vie courte de 0.87 ns et l'autre nanoseconde (3.24 ns). La durée de vie en milieu aqueux et en milieu cellulaire du marqueur mitochondrial n'est pas répertoriée. De même, la durée de vie du BODIPY FL est généralement donnée lorsque la molécule est en solution dans le méthanol (soit 5.7 ns [40]).

D'après les images d'intensité de fluorescence de la Figure I.3-3 B, à 780 nm , on excite essentiellement le DAPI concentré dans le noyau de la cellule tandis qu'à la longueur 850 nm , on excite les marqueurs des filaments d'actine et les marqueurs des mitochondries localisés dans le cytoplasme.

Les images de fluorescence 3D résolue en temps ont été enregistrées et ont révélées (Figure I.3-3 C-D) que la durée de vie était homogène quel que soit le plan z . On peut néanmoins observer une légère différence de durée de vie pour les plans extrêmes, qui n'excédera pas 5%, qui est due à une sous-estimation de la valeur de la durée de vie de fluorescence en raison d'un faible taux de comptage pour les plans éloignés du plan focal (non montrés ici). Après traitement, on obtient pour le DAPI une durée de vie moyenne d'environ $1.9 \pm 0.1 \text{ ns}$.

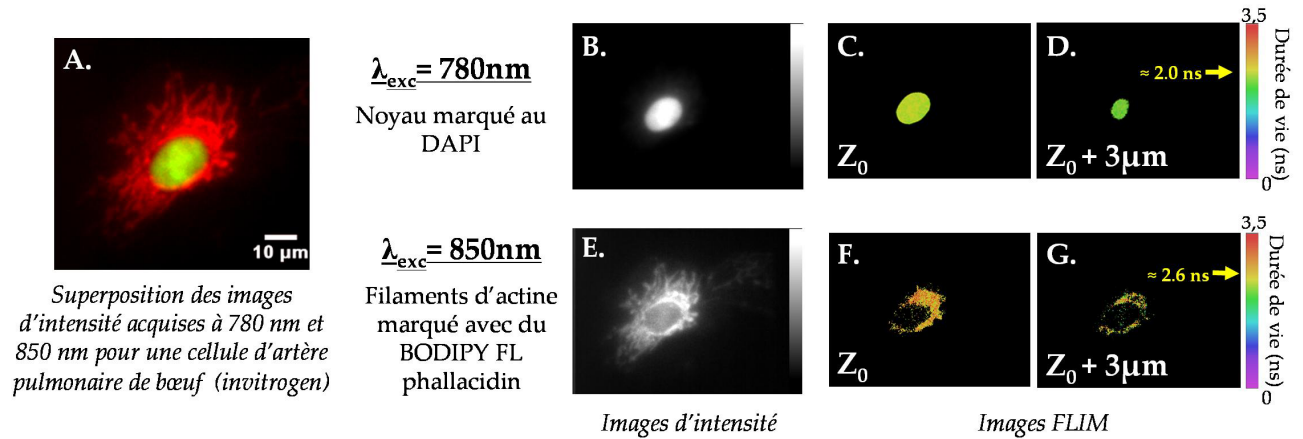


Figure I.3-3 : Cellules d'artères de bœuf fixées dont le noyau est marqué au DAPI, les filaments d'actine par du BODIPY et les mitochondries par un mitotracker. A Image d'intensité de fluorescence correspondant à la superposition des images acquises à 780 nm (en vert) et à 850 nm (en rouge) ; B-E Images d'intensité de fluorescence dans le plan focal de l'objectif pour une excitation à 780 nm et 850 nm, respectivement ; Images de durée de vie pour deux profondeurs différentes (déplacement du scan 20 lignes, 20 colonnes, par pas de 1 μm , 10 ms par points), C-D pour une excitation à 780 nm et F-G pour une excitation à 850 nm.

En comparant cette valeur à la durée de vie moyenne de fluorescence du complexe DAPI-ADN en solution référencée dans la littérature, on constate qu'il y a une différence significative. Si on effectue une étude plus détaillée du déclin de fluorescence du DAPI en utilisant un modèle biexponentiel, on trouve deux durées de vie de 1.1 ns et 2.8 ns (avec respectivement des poids de 0.49 et 0.51) soit une durée de vie moyenne de 2 ns ce qui est très proche du résultat obtenu avec la méthode de traitement du système MMM. Les différences observées peuvent provenir de la nature de l'échantillon puisqu'il s'agit ici de cellules fixées dont les propriétés de fluorescence peuvent être modifiées par la fixation.

A 850 nm, l'excitation est un peu moins sélective puisque le BODIPY, le DAPI et éventuellement le mitotracker peuvent être excités simultanément. On remarque d'ailleurs sur la Figure I.3-3 E qu'un signal de fluorescence, provenant du noyau, est détecté. Néanmoins, en choisissant un seuil adapté pour le traitement du signal de fluorescence, on peut extraire la durée de vie moyenne du BODIPY, $\tau = 2.6 \pm 0.2$ ns (Figure I.3-3 F-G).

Cette étude montre qu'il est possible d'utiliser l'accordabilité du laser Ti:saphir pour exciter sélectivement des fluorophores différents au sein d'une même cellule et de réaliser des images de fluorescence 4D.

Par la suite, nous avons étudié un échantillon moins robuste, dont les résultats en durée de vie ont été comparés à ceux obtenus avec un microscope de fluorescence sous excitation à deux photons appelé IDEFIX (Annexe A 2), utilisant la méthode du comptage de photon unique pour la détection (TCSPC).

Optimisation sur les lames de cytologie

Une collaboration avec des médecins urologues a été mise en place dans notre équipe pour répondre à un besoin : celui d'améliorer la sensibilité du diagnostic des cancers urothéliaux. Une étude approfondie de la fluorescence des échantillons sur lesquels les médecins établissent leur diagnostic, a été réalisée [41]. Profitant de ce contexte, nous avons utilisé les échantillons de cytologies urinaires colorés et fixés pour évaluer la pertinence des résultats obtenus avec notre système MMM en durée de vie par rapport à ceux obtenus avec le montage IDEFIX (Annexe A 2).

Ces échantillons comportent deux familles de cellules, présentant des comportements en fluorescence bien distincts : les cellules dites « saines » qui ont une fluorescence intracellulaire et les cellules tumorales qui présentent une fluorescence périmembranaire. L'excitation des échantillons a été réalisée à 800 nm et l'acquisition des durées de vie a été obtenue en utilisant une largeur des portes temporelles de 500 ps.

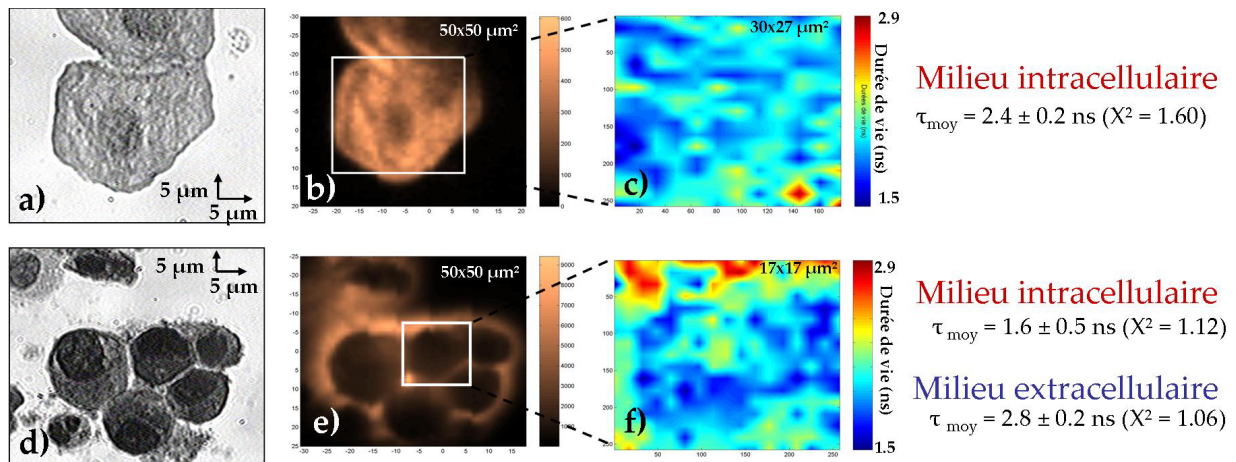


Figure I.3-4 : Images de cellules urothéliales obtenues avec le montage IDEFIX : $\lambda_{exc}=800nm$, $P_{moy}= 10 mW$ avant l'entrée du microscope et le temps d'exposition par points de mesure est de 1 s : **a)** Images en transmission d'une cellule normale, **b)** son image d'intensité de fluorescence, **c)** son image de durée de vie de fluorescence à l'intérieur de la zone matérialisée par un rectangle blanc, avec la durée de vie moyenne du milieu intracellulaire obtenue par la méthode MLE ; **d)** image en transmission d'un amas tumoral, **e)** son image d'intensité de fluorescence, **f)** et son image de durée de vie de fluorescence avec les durées de vie moyenne calculées par MLE dans le milieu intracellulaire et extracellulaire (zone repérée par un rectangle blanc).

La Figure I.3-4 représente les données acquises avec le système de microscopie de fluorescence TCSPC : la durée de vie moyenne intracellulaire d'une cellule normale est de $2.4 \pm 0.2 ns$ et celle d'une cellule tumorale de $1.6 \pm 0.5 ns$. Pour ces cellules, une fluorescence périmembranaire est également observée avec une durée de vie de $2.8 \pm 0.2 ns$. Le même type de mesure a été réalisé sur notre système MMM et est présenté sur la Figure I.3-5:

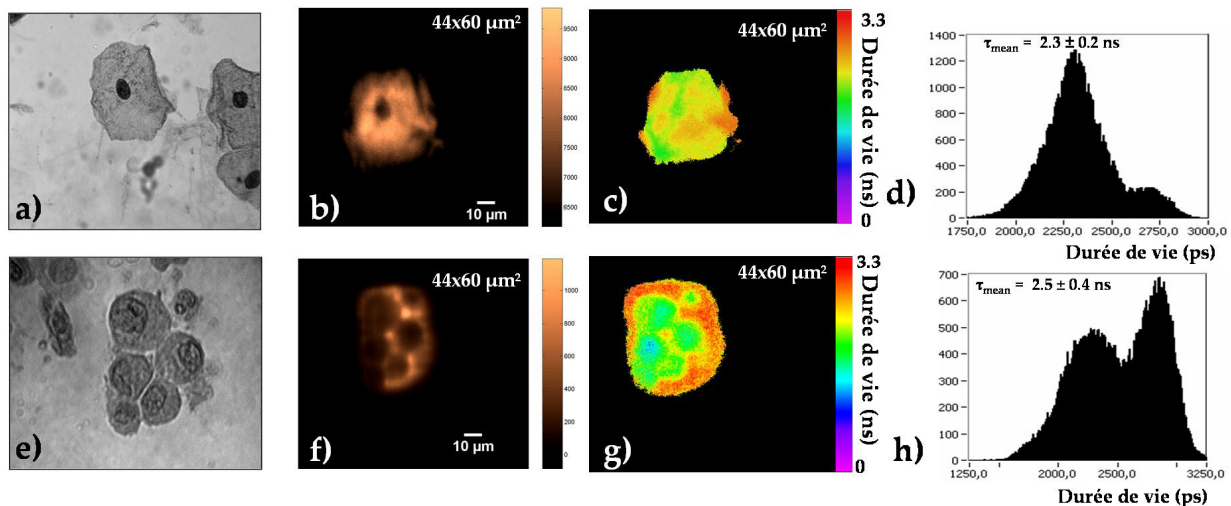


Figure I.3-5 : Images réalisées avec le dispositif MMM sur une cellule normale de **a)-d)** et sur un amas de cellules tumorales de **e)-h)** Pour chacun des types cellulaires, nous avons enregistré de gauche à droite, l'image de transmission, l'image d'intensité de fluorescence, l'image de durée de vie et le diagramme de répartition des durées de vie avec la durée de vie moyenne associée.

Du point de vue de la localisation du signal de fluorescence, les résultats enregistrés sont identiques avec les deux montages : on observe une fluorescence intracellulaire pour les cellules normales et une fluorescence essentiellement périmembranaire pour les cellules tumorales. Les durées de vie ont également été enregistrées et sont représentées sous forme de carte de durées de vie et d'histogramme (Figure I.3-5 c-h). La durée de vie intracellulaire des cellules normales, déterminée avec le dispositif MMM, est de $2.3 \pm 0.2 ns$ ce qui est en parfait accord avec les valeurs trouvées avec le système IDEFIX.

L'image de durée de vie des cellules tumorales, (Figure I.3-5 g) montre deux durées de vie moyenne différenciées l'une de 2.2 ± 0.4 ns (signal de fluorescence intracellulaire) et l'autre de 2.8 ± 0.4 ns (signal de fluorescence périmembranaire). Ces résultats sont aussi en accord avec ceux obtenus grâce au dispositif IDEFIX (méthode TCSPC).

En conclusion, les durées de vie sont comparables d'une technique à l'autre avec un gain en temps d'acquisition d'un facteur d'environ 40, pour le système MMM utilisant un système de détection caméra/porte-temporelle par rapport au système utilisant la méthode TCSPC (en supposant que les deux systèmes explorent des zones d'intérêt de surface équivalente). Or, les surfaces scannées par le montage MMM sont toujours plus importantes que celles explorées par le montage d'excitation monopoint IDEFIX.

De tels résultats sont encourageants pour une application du dispositif MMM à la lecture rapide des lames de cytologies. Cet aspect sera abordé dans la partie II de ce travail où ce dispositif MMM a justement été utilisé lors d'une étude réalisée sur des lames de cytologie du col de l'utérus.

Pour le cas qui vient d'être étudié, le temps d'acquisition des images de fluorescence n'est pas un point critique car il s'agit d'échantillons relativement robustes. Afin de réellement éprouver la technologie MMM, l'étude d'un photosensibilisateur en milieu cellulaire a été menée.

I.3.2.2. Etude d'un photosensibilisateur en milieu cellulaire

La thérapie photodynamique (PDT) est une voie de traitement de certains cancers qui peut être utilisée soit en complément, soit en remplacement des thérapies classiquement utilisées comme la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

Pour ce type de traitement, on injecte chez le patient une molécule appelée photosensibilisateur qui ne s'active qu'une fois soumise à un rayonnement lumineux. Après injection, le photosensibilisateur se concentre plus ou moins spécifiquement dans les tissus tumoraux. Ces tissus sont ensuite irradiés localement par une source lumineuse appropriée, ce qui conduit à la nécrose ou à l'apoptose des cellules cancéreuses.

Par conséquent, la thérapie photodynamique endommage de façon plus sélective les tissus tumoraux qu'une chimiothérapie classique. Son efficacité dépend principalement de la vitesse à laquelle le sensibilisateur s'accumule à l'intérieur des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et de son effet cytotoxique en présence de lumière. L'étude des mécanismes d'action des photosensibilisateurs et de leur localisation cellulaire est donc une étape fondamentale dans la sélection et l'optimisation de ceux qui seront utilisés en PDT.

Les photosensibilisateurs utilisés en thérapie photodynamique sont particulièrement délicats à étudier en milieu cellulaire : les propriétés photosensibilisatrices de ces molécules peuvent être un obstacle majeur pour l'étude de leurs propriétés photophysiques, comme par exemple leur émission de fluorescence en milieu cellulaire. On comprend aisément que, dans ce cas, la microscopie de fluorescence multiphotons multipoints, qui permet de réduire drastiquement le temps d'acquisition des données, puisse être un outil particulièrement adapté.

La molécule étudiée ici est le pyrophéophorbide-a méthyl ester ou PPME dont l'étude photophysique a déjà été réalisée en solution [42] et en milieu cellulaire [43-45]. Libre, ce photosensibilisateur présente des propriétés photophysiques et une activité photodynamique bien spécifiques, qui seront présentées par la suite. En outre, il s'est avéré que son encapsulation au sein de liposomes pouvait influencer son activité photodynamique.

I.3.2.2.1. Mode d'action des photosensibilisateurs

Différents mécanismes peuvent être envisagés en fonction des propriétés photophysiques du photosensibilisateur. Le diagramme simplifié de Jablonski de la Figure I.3-6 présente les différentes voies de réactions possibles, à partir des états excités de la molécule :

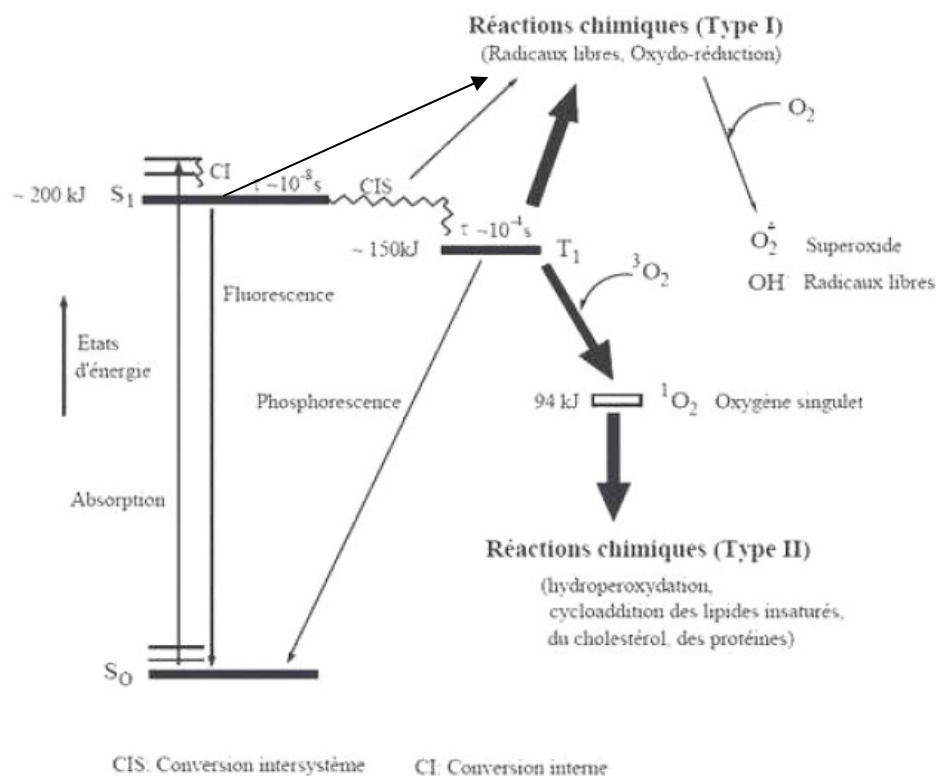


Figure I.3-6 : Diagramme simplifié de Jablonski [46] incluant l'action de l'oxygène avec les états excités du photosensibilisateur.

Ce diagramme montre comment des molécules normalement insensibles à l'excitation laser, comme le dioxygène, peuvent être impliquées dans des réactions photochimiques avec un photosensibilisateur (dans l'un de ses états excités). Lors de l'absorption de lumière (phénomène très rapide $\sim 10^{-15}$ s), le photosensibilisateur passe de son état singulet fondamental S_0 à des états singulets de plus haute énergie (S_1, S_2, \dots, S_n). A partir de l'état S_1 (de courte durée de vie 10^{-10} à 10^{-7} s), il peut y avoir transfert d'énergie vers l'état triplet T_1 par conversion intersystème (ISC). La durée de vie, relativement longue, de cet état triplet (de 10^{-6} à 1 s) permet à la molécule d'interagir par diffusion avec les substrats situés dans son microenvironnement.

Deux mécanismes réactionnels sont envisageables à partir des états excités du photosensibilisateur [47] : les mécanismes de type I et de type II.

Mécanisme de type I

Les molécules dans leur état singulet et/ou triplet peuvent réagir directement avec des substrats biologiques par transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène ce qui conduit à la formation d'espèces radicalaires (réactions non limitées par la diffusion). Les radicaux libres, ainsi formés, peuvent réagir avec l'oxygène dans son état fondamental pour former l'ion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, ainsi que d'autres types d'entités radicalaires appelées espèces réactives de l'oxygène ou ROS.

Mécanisme de type II

Le photosensibilisateur dans son état triplet T_1 réagit avec le dioxygène dans son état fondamental triplet 3O_2 en lui transférant son excès d'énergie. L'oxygène triplet passe dans son état singulet 1O_2 (puissant oxydant) qui va pouvoir réagir avec les biopolymères de la cellule, comme les triacyles glycérols saturés, le cholestérol des membranes, les phospholipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

L'ensemble de ces processus entraîne la dégradation d'un grand nombre de constituants cellulaires conduisant à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose, selon la nature des espèces radicalaires formées. Comparée à la nécrose, l'apoptose n'entraîne pas d'inflammation. Les photosensibilisateurs qui déclenchent, après photo-activation, un processus d'apoptose au sein des cellules tumorales sont donc privilégiés par rapport aux autres.

I.3.2.2.2. Le PPME : état des connaissances

Le photosensibilisateur étudié, le pyrophéophorbide a methyl ester ou PPME, fait partie des molécules de deuxième génération. Ce sont des molécules de synthèse qui sont éliminées plus facilement que les molécules d'origine naturelle et pour lesquelles les risques de photosensibilisation secondaire sont moins importants. Il est non toxique à l'abri de la lumière [45] et limite la phototoxicité pour les tissus sains. Il peut se localiser dans les membranes plasmiques et s'accumuler dans le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les lysosomes et les mitochondries [44, 45], en fonction de la nature de la cellule.

Notre étude a porté sur des lignées cellulaires cancéreuses du colon HCT-116.

Localisation du PPME libre dans les cellules HCT-116

L'équipe de Matroule [44] a montré que dans ce type de cellules, le PPME se localise spécifiquement dans tous les organites cités dans le paragraphe précédent sauf dans les mitochondries. L'oxygène singulet 1O_2 et les ROS produits (tels que OH^\bullet , H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$) par la photoactivation du PPME dans ces entités intracellulaires conduisent à la mort cellulaire par nécrose et par apoptose [44]. Pour expliquer l'existence du phénomène d'apoptose, une hypothèse a été émise selon laquelle les ROS produits au sein du RE et de l'appareil de Golgi sont la source principale du stress oxydant dans les mitochondries, déclenchant alors un processus apoptotique. Le mécanisme global d'action du PPME au sein des cellules HCT 116 est représenté sur la Figure I.3-7 :

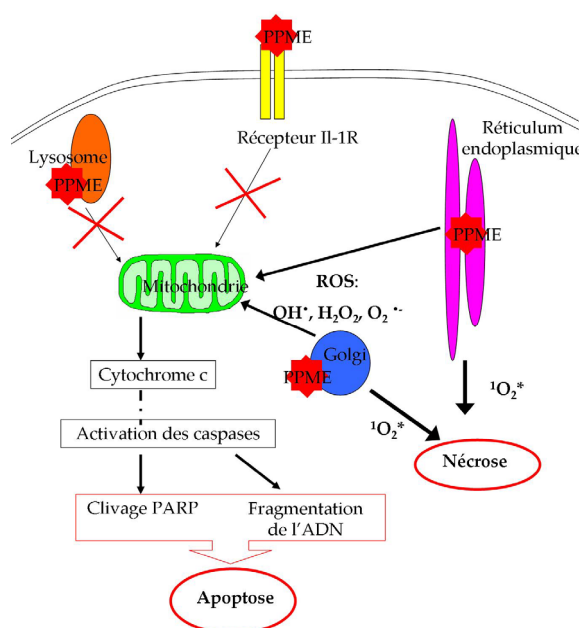


Figure I.3-7 : Modèle simplifié de l'action du PPME dans les cellules HCT-116, d'après le travail de Matroule et al. [44]

Malheureusement, le PPME est peu soluble en milieu aqueux et a une forte propension à s'agréger [42]. Or, en milieu cellulaire, ces formes agrégées se localisent préférentiellement dans les liposomes où l'activité photodynamique du PPME est limitée.

L'équipe du laboratoire de Spectroscopie Biomédicale de l'Université de Liège a montré que l'activité photodynamique du PPME est améliorée en le solubilisant dans des liposomes de DMPC (dimyristoil-L- α phosphatidyle choline).

Localisation du PPME encapsulé dans les liposomes au sein des cellules HCT-116

L'encapsulation du PPME dans les liposomes modifie la localisation du PPME dans les cellules en favorisant son accumulation dans les mitochondries [42], ce qui a été démontré au laboratoire par des mesures de colocalisation cellulaire par microscopie de fluorescence confocale. Ce phénomène est associé à une amplification du mécanisme d'apoptose par rapport à la nécrose ce qui correspond à l'une des spécificités attendue chez un « bon » photosensibilisateur.

Du point de vue réactionnel, les études menées par RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) et par absorption transitoire nanoseconde ont permis d'identifier les ROS produits au cours de l'activation de PPME en solution. On sait déjà que l'oxygène singulet est produit à partir de l'état triplet excité du photosensibilisateur. Les autres ROS (H^\bullet , OH^\bullet) sont supposées être issues de réactions à partir de l'état singulet excité du PPME [42].

Pour améliorer cet état des connaissances, il était important de mener une étude dynamique de la fluorescence du PPME libre et encapsulé dans des liposomes, ceci afin d'identifier d'autres mécanismes réactionnels du PPME en milieu cellulaire, comme des interactions avec les entités intracellulaires ou des transferts de charge ou d'énergie

En utilisant le système d'imagerie monopoint IDEFIX, il s'est avéré difficile de déterminer les propriétés dynamiques de fluorescence du PPME (voir paragraphe I.3.2.2.4). Notre système de microscopie multipoints a permis de résoudre ce problème et de réaliser une étude dynamique de la fluorescence du PPME en limitant les photodommages induits par sa photoactivation sur les cellules.

I.3.2.2.3. Propriétés photophysiques du PPME libre et solubilisé dans des liposomes

Dans un premier temps, nous rappelons les propriétés photophysiques du PPME libre et solubilisé dans les liposomes en solution.

Spectroscopie d'absorption

Le PPME dérive de la chlorophylle a [48-50]. Sa structure présente un cycle tétrapyrrole (Figure I.3-8) avec un système π . Le PPME fortement hydrophobe est soluble notamment dans le méthanol, l'éthanol et le DMSO. Pour ces solvants, aucune modification du spectre d'absorption n'est observée. Par contre, dans les solvants aqueux, la molécule sera sous forme agrégée ce qui entraînera des modifications du spectre d'absorption.

Le spectre du PPME dans le DMSO présente une bande d'absorption majoritaire centrée à 414 nm (bande de Soret, transition $\pi\pi^*$) et une bande centrée à 667 nm avec trois autres maxima pointant à 509 nm, 539 nm et 610 nm (Figure I.3-9 A.). Ces dernières correspondent aux deux bandes Qx (509 et 539 nm) et aux deux bandes Qy (610 et 667 nm). Le coefficient d'extinction molaire à 667 nm est de $4,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et à 414 nm, il est de $9,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [42].

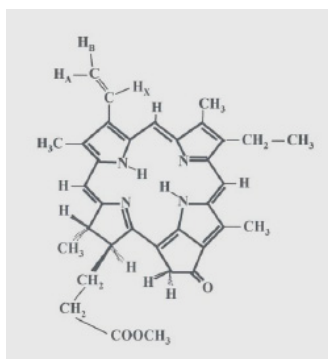


Figure I.3-8 : Structure chimique du PPME.

En milieux aqueux, la molécule a tendance à s'agréger ce qui entraîne une déformation du spectre d'absorption (Figure I.3-9 A.): la bande de Soret s'élargit fortement (effet de diffusion) et on observe un déplacement de la bande d'absorption Qy (667 nm) vers le rouge (682 nm).

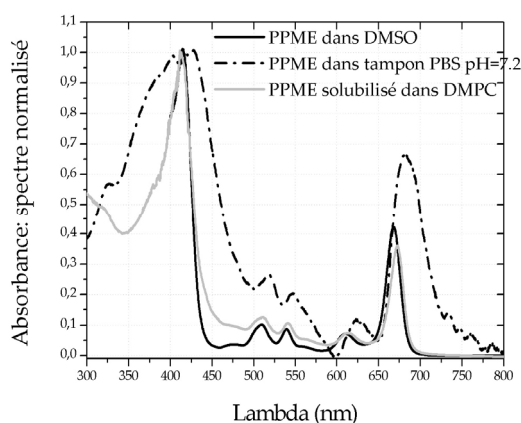


Figure I.3-9 : Spectre d'absorption normalisé du PPME dans différents solvants et solubilisé dans les liposomes de DMPC.

Les liposomes dans lesquels le PPME est solubilisé sont unilamellaires avec une taille d'environ 90 nm (DMPC, voir Annexe A3). Le spectre d'absorption du PPME dans les liposomes est très proche de celui enregistré pour le PPME dans le DMSO (Figure I.3-9 A.): on retrouve les mêmes structures de bande mais celle centrée à 667 nm est déplacée de quelques nanomètres vers le rouge à 672 nm et est moins intense (effet bathochrome et hypochrome, son coefficient d'extinction molaire est de $4,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [42]).

Emission de fluorescence

Le spectre d'émission de fluorescence du PPME dans l'éthanol présente deux maxima à 673 nm et à 720 nm (Figure I.3-10 A). En milieu aqueux, les longueurs d'onde des maxima d'émission de fluorescence sont conservées mais on observe une très forte diminution de la fluorescence (plus d'un ordre de grandeur entre le PPME dans le DMSO et le PPME dans le tampon phosphate ou PBS) car les agrégats sont non fluorescents.

Les mesures de durée de vie du PPME, dans le tampon PBS, se sont avérées non reproductibles et n'ont pas pu aboutir. Pour le photosensibilisateur dans l'éthanol, la durée de vie de fluorescence a été mesurée sur les deux systèmes de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons disponibles au laboratoire, IDEFIX et MMM (Figure I.3-10 B). Les résultats obtenus sont identiques et le déclin peut être ajusté par un modèle monoexponentiel : on obtient une durée de vie de fluorescence $\tau_{\text{PPME}} = 6,0 \pm 0,5 \text{ ns}$.

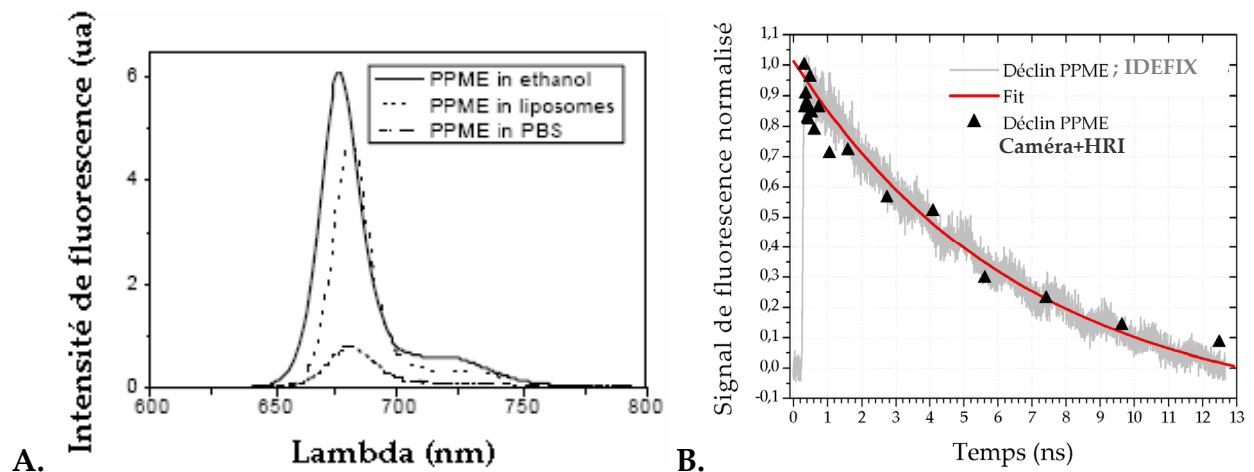


Figure I.3-10 :A. Spectre d'émission de fluorescence du PPME libre dans l'éthanol, les liposomes et le PBS pour une concentration de $2 \mu\text{M}$, tiré de [42] B. Déclin de fluorescence pour le PPME dans de l'éthanol obtenu par la méthode de comptage de photon unique du dispositif IDEFIX comparée à la méthode utilisant le système caméra/porte temporelle du système MMM.

Le spectre d'émission de fluorescence du PPME solubilisé dans les liposomes présente une allure semblable à celui du PPME libre dans l'éthanol mais le maximum d'émission est déplacé vers le rouge d'environ 6 nm (de 673 nm à 679 nm, Figure I.3-9 B)

Compte tenu de la précision des mesures, la durée de vie de fluorescence du PPME solubilisé dans les liposomes en solution est identique à celle mesurée pour le PPME libre dans l'éthanol : $\tau_{\text{lipoppme}} = 6,8 \pm 0,6$ ns (Figure I.3-15 courbe en noir), ce qui prouve que le PPME est sous forme monomérique dans une solution d'éthanol.

De plus, il a été prouvé que le PPME libre possède une bonne photostabilité [45].

I.3.2.2.4. Etude en milieu cellulaire : Imagerie résolue en temps par MMM

Les cellules de la lignée cellulaire HCT-116 (références et mise en culture Annexe A 3) sont incubées avec le photosensibilisateur pendant 20 h à l'abri de la lumière, à 37°C . La concentration du PPME libre est de $20 \mu\text{M}$ et celle du PPME encapsulé dans les liposomes est de $10 \mu\text{M}$. Une fois la période d'incubation terminée, les cellules sont rincées au PBS et remises dans un milieu de culture minimum type appelé HBSS.

Etude du PPME en milieu cellulaire avec le dispositif MMM

Les premières mesures réalisées en milieu cellulaire par microscopie confocale, en excitant avec la raie laser 633 nm, ont mis en évidence que l'intensité de fluorescence des cellules incubées avec le PPME seul était très inférieure à celle des cellules incubées avec le PPME solubilisé dans les liposomes (Figure I.3-11). Cependant, quel que soit son conditionnement, le PPME se localise préférentiellement dans le cytoplasme et les membranes cytoplasmiques.

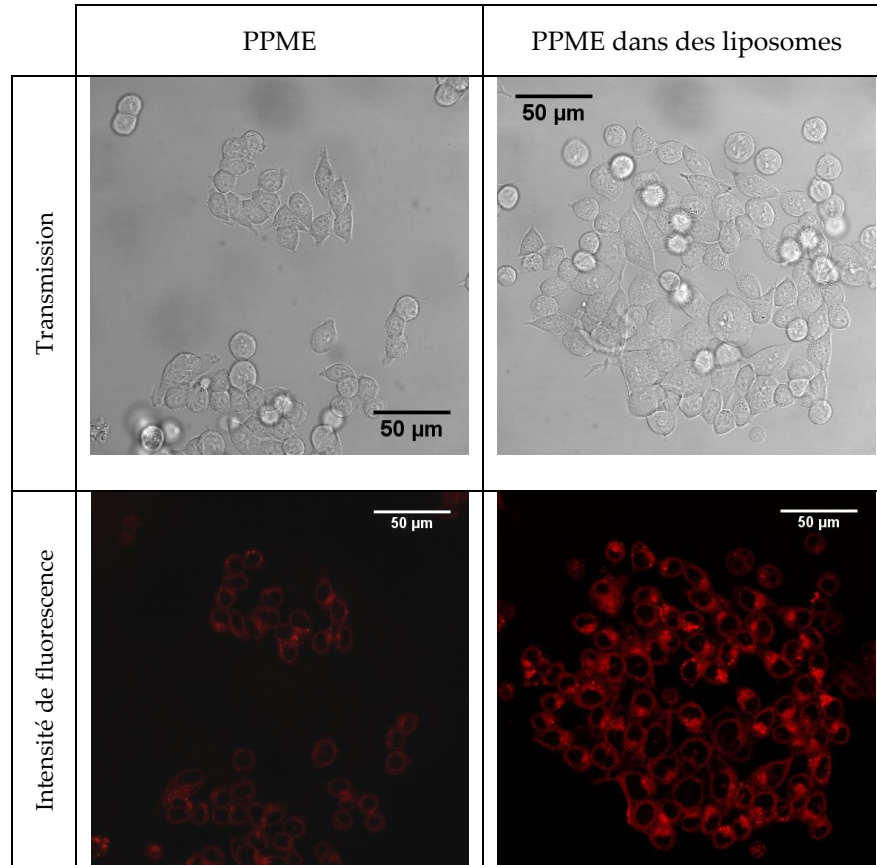


Figure I.3-11 : Images en transmission et images d'intensité de fluorescence de cellules HCT-116 incubées respectivement avec le PPME seul et avec le PPME encapsulé dans des liposomes ; $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, intervalle spectral de détection compris entre 650 et 800 nm.

La faible intensité de fluorescence du PPME libre en milieu cellulaire a été un obstacle pour l'étude de ses propriétés de fluorescence dynamiques avec le montage IDEFIX. En effet, il a été impossible d'enregistrer une image FLIM avec ce dispositif. Ce fut d'autant plus difficile que la galette de microcanaux utilisée pour la détection du signal de fluorescence dans le montage IDEFIX est très peu sensible dans le domaine spectral du proche IR ($> 650 \text{ nm}$) alors que le maximum d'émission du PPME en solution est centré aux environs de 670 nm.

Nous avons remédié à ce problème en réalisant notre étude avec le dispositif MMM. En effet, de part sa rapidité d'acquisition et la sensibilité de son détecteur dans le proche IR (Figure I.2-8 et Figure I.2-10) plus grande que celle de la galette de microcanaux du montage IDEFIX, notre dispositif nous a permis de procéder à l'étude dynamique du PPME libre en milieu cellulaire.

Les données d'intensité de fluorescence et FLIM ont été acquises pour deux positions en z et sont représentées sur la Figure I.3-12. D'après les images d'intensité de fluorescence (Figure I.3-12 B et C), nous avons confirmé que la localisation intracellulaire du PPME dans les cellules est préférentiellement cytoplasmique et membranaire.

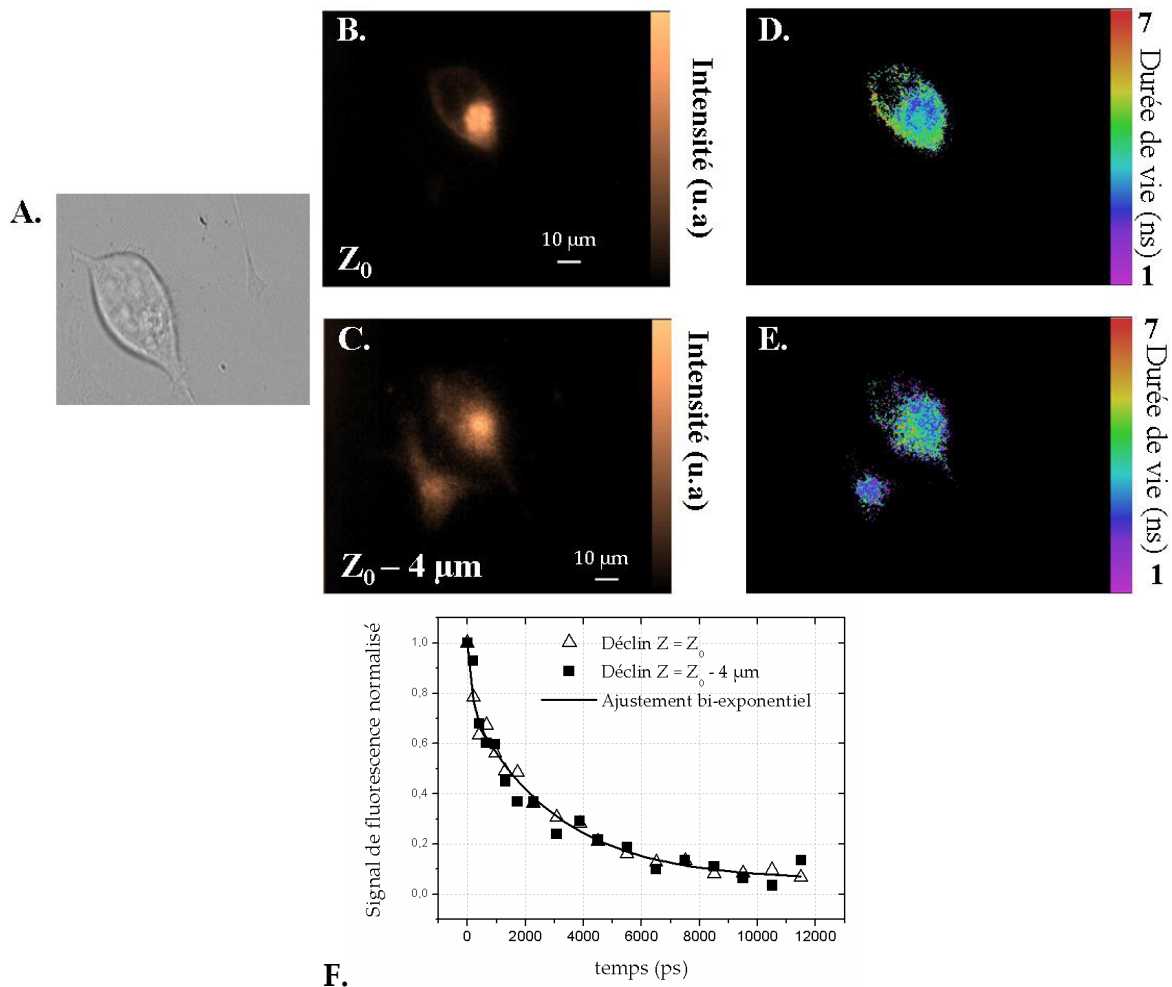


Figure I.3-12 : Intensité et durée de vie de fluorescence du PPME libre dans les cellules HCT-116 pour deux profondeurs différentes dans la cellule ; la vitesse de balayage des miroirs galvanométriques est de 100 Hz pour une surface de $44 \times 60 \mu\text{m}^2$ soit un temps d'acquisition d'environ 4 s pour une image d'intensité de fluorescence ; A. Image en transmission de la cellule, B et C. Images d'intensité de fluorescence pour deux profondeurs différentes, D et E. Images de durée de vie associée aux images d'intensité, F. Déclin de fluorescence moyen avec un ajustement bi-exponentiel.

La durée de vie est identique dans chacun des plans et les deux déclins montrent qu'il n'y a pas d'altération de la qualité de la mesure en faisant varier la position sur l'axe z. La durée de vie moyenne déterminée en temps réel par la méthode monoexponentielle est de 3.1 ns. Si on étudie plus finement ces déclins, il s'avère qu'ils peuvent être ajustés selon un modèle biexponentiel. On trouve alors deux composantes $\tau_1 = 0.5 \pm 0.2 \text{ ns}$ et $\tau_2 = 3.9 \pm 0.5 \text{ ns}$ (détail de l'ajustement dans le Tableau I.3-1). Il est important de noter que ces mesures ont pu être réalisées sur une cellule complète sans engendrer de photodégradation.

Etude du PPME encapsulé dans des liposomes

Si des images FLIM du PPME en milieu cellulaire n'ont pas été obtenues avec le montage IDEFIX, il a malgré tout été possible de faire des mesures dans le cas où le photosensibilisateur est incorporé dans les liposomes, en raison d'une accumulation intracellulaire plus importante de photosensibilisateur dans ces conditions (Figure I.3-11). Une première estimation des durées de vie du PPME dans les liposomes a pu ainsi être obtenue avec le dispositif IDEFIX.

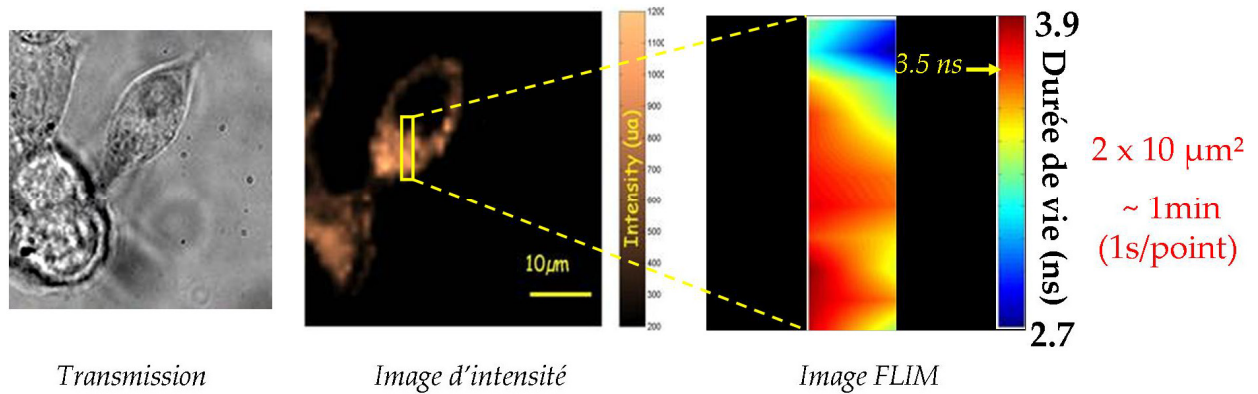


Figure I.3-13 : Image en transmission, image d'intensité de fluorescence et de durée de vie de fluorescence (de la zone matérialisée par un rectangle jaune) des cellules HCT-116 incubées avec 10 μM de PPME solubilisé dans des liposomes, enregistrées avec le montage IDEFIX.

D'après la Figure I.3-13, le PPME solubilisé dans les liposomes se localise essentiellement dans le cytoplasme et la membrane plasmique, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par microscopie confocale. La durée de vie moyenne du PPME encapsulé dans des liposomes en milieu cellulaire a été estimée à 3.5 ± 0.3 ns.

Il s'est avéré qu'il était difficile d'acquérir plus de 20 points pour reconstituer une image FLIM avant d'observer une photodégradation des cellules (illustré en Figure I.3-13), ce qui limite l'exploration des durées de vie et empêche d'avoir la répartition complète de celle-ci dans toute la cellule.

Le même type d'acquisition a alors été mené avec le dispositif MMM, avec en plus, l'acquisition d'images 3D résolues en temps. La vitesse de balayage du scan laser était de 100 Hz pour une surface sondée dans le plan focal de $44 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$.

L'image d'intensité de fluorescence de la Figure I.3-14 montre que le PPME dans les liposomes se localise dans tout le cytoplasme de la cellule, ce qui est en parfait accord avec les résultats obtenus jusqu'à présent.

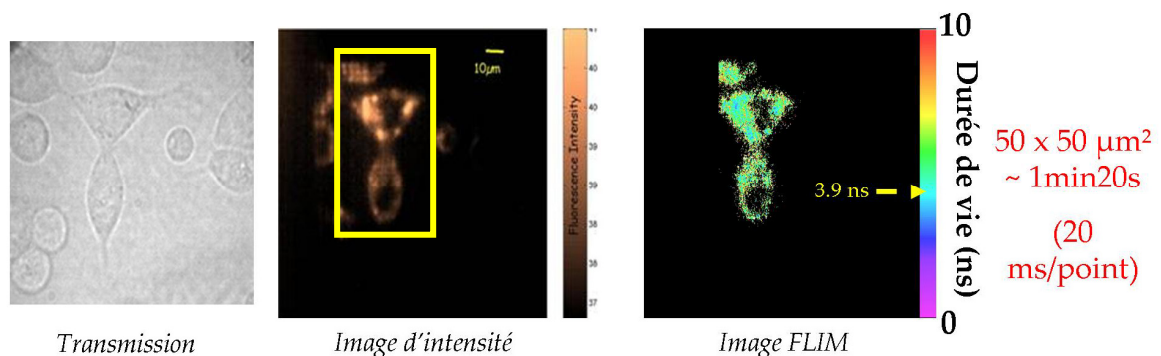


Figure I.3-14 : Images en transmission, d'intensité de fluorescence et de durée de vie de fluorescence de cellules HCT-116 incubées pendant 20 heures avec du PPME solubilisé dans des liposomes.

La carte de répartition des durées de vie a été acquise sur toute une cellule. Quelle que soit la zone explorée dans le cytoplasme, la valeur moyenne est à peu près identique en tout point de la cellule et est égale à 3.9 ± 0.4 ns. Des images 3D sur l'ensemble d'une cellule ont pu être enregistrées, tout en limitant au maximum les photodommages induits par la photoactivation du photosensibilisateur. On montre ainsi tout l'intérêt d'utiliser ce dispositif, puisque l'on peut avoir accès aux informations sur le signal de fluorescence dans tout le volume de la cellule.

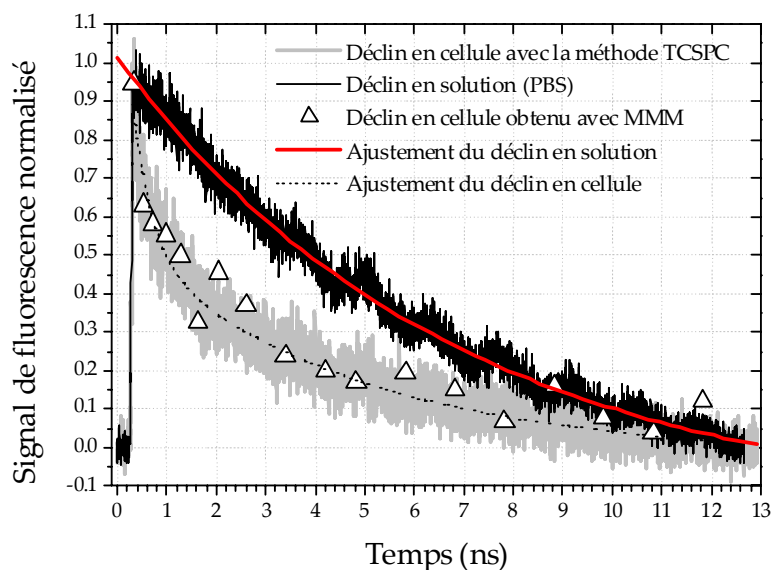


Figure I.3-15 : Déclins du PPME solubilisé dans les liposomes de DMPC, $[PPME] = 10 \mu\text{M}$ et $[DMPC] / [PPME] = 135$ à 26°C , en solution dans le PBS et incorporé dans les cellules, pour les deux techniques de détection (TCSPC et le système de caméra/porte-temporelle).

Le but de cette étude est d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes qui peuvent avoir lieu dans l'état excité S_1 du PPME. Par conséquent, une étude fine des déclin de fluorescence a été réalisée en utilisant un ajustement biexponentiel (Figure I.3-15). On dégage ainsi deux composantes : une composante de durée de vie courte, $\tau_1 = 0,7 \pm 0,2 \text{ ns}$ et une autre composante de l'ordre de la nanoseconde, $\tau_2 = 6.2 \pm 0.6 \text{ ns}$. La composante de durée de vie courte est identique à celle trouvée pour le PPME libre en milieu cellulaire alors que la composante longue est proche de la valeur trouvée pour le PPME solubilisé dans les liposomes en solution.

Nous allons voir, par la suite, ce que ces résultats nous apportent comme information sur la réactivité de l'état excité S_1 du PPME.

I.3.2.2.5. Interprétations

La localisation du photosensibilisateur dans les cellules HCT-116 est intracellulaire et elle semble identique que le PPME soit ou non encapsulé dans des liposomes. Cette localisation a récemment été précisée par des mesures de colocalisation en microscopie confocale. Au cours de cette étude, des marqueurs mitochondriaux ont été utilisés ce qui a permis de montrer que le PPME solubilisé dans les liposomes par rapport à sa forme libre, se localise aussi dans les mitochondries [51]. L'ensemble des résultats de fluorescence dynamique obtenus pour le PPME en milieu cellulaire est récapitulé dans le Tableau I.3-1 :

Durée de vie	PPME	PPME dans liposomes
τ_1	$0.5 \pm 0.2 \text{ ns}$	$0.7 \pm 0.2 \text{ ns}$
A1	0.46	0.51
τ_2	$3.9 \pm 0.5 \text{ ns}$	$6.2 \pm 0.6 \text{ ns}$
A2	0.54	0.49
τ_{moy}	2.4	3.4
τ_{moy} (MMM)	$3.1 \pm 0.7 \text{ ns}$	$3.9 \pm 0.7 \text{ ns}$

Tableau I.3-1 : Tableau récapitulatif des durées de vie obtenues pour le PPME libre et dans des liposomes dans les cellules HCT-116, avec A_i le poids de chacune des composantes sur la fluorescence totale.

On constate que les durées de vie moyennes, déterminées par la méthode monoexponentielle du montage MMM, pour le PPME sous forme libre et incorporé dans les liposomes sont très proches. L'ajustement plus fin de ces déclin de durée de vie a permis de mettre en évidence l'existence de deux composantes.

Dans chacun des cas, le déclin de fluorescence comporte une composante rapide de 0.5-0.7 ns et une composante nanoseconde.

Dans le cas où le PPME est encapsulé dans des liposomes, la composante nanoseconde est proche de celle obtenue pour la molécule en solution et la composante rapide est spécifique du photosensibilisateur en milieu cellulaire.

Nous rappelons que nous ne pouvons pas faire de comparatifs pour le PPME sous sa forme libre en solution aqueuse puisqu'il a été impossible d'enregistrer son déclin de fluorescence dans ces conditions.

En milieu cellulaire, on observe que la composante de durée de vie longue du PPME est plus courte que celle du PPME dans les liposomes en milieu cellulaire. Ce résultat peut s'interpréter comme l'existence en milieu cellulaire d'un mélange de formes agrégées du PPME (non fluorescentes) et de formes libres.

Ces résultats suggèrent que la moitié des molécules de PPME, quel que soit son conditionnement, est présente au sein des cellules sans développer d'interactions spécifiques avec le milieu environnant et que l'autre moitié interagit avec les composants cellulaires, ce qui conduit à une diminution de la durée de vie de fluorescence de l'état excité singulet du PPME.

Les affinités développées par le PPME avec les biopolymères de la cellule sont sans doute de différentes natures : par exemple, des complexes PPME-biomolécules peuvent se former et des phénomènes de transferts d'énergie ou de charges peuvent apparaître ce qui pourrait justifier l'existence d'une durée de vie courte. Ce point n'a pas pu être complètement explicité dans le cadre de ce travail.

L'étude dynamique du PPME sous forme libre et encapsulé dans les liposomes, en milieu cellulaire, a permis d'obtenir les cartes de répartition des durées de vie sur toute la cellule et pour différents plans de l'axe z. Ce travail donne une première idée de l'évolution des durées de vie par rapport aux résultats obtenus en solution, mais, il faudrait effectuer une étude plus approfondie avec d'autres méthodes instrumentales (RPE cellulaire) pour comprendre les mécanismes photophysiques sous-jacents.

I.4. Conclusion

L'ensemble des expériences effectuées sur différents types d'échantillons fixés ou vivants a permis de valider notre système MMM et de montrer sa pertinence et son efficacité sur l'étude de systèmes minces par microscopie de fluorescence résolue temporellement.

Nous avons réussi à réduire le temps d'acquisition des images FLIM et à enregistrer sur des échantillons biologiques fragiles des images 3D résolues temporellement avec une bonne résolution spatiale. Plus précisément, le dispositif MMM s'est avéré particulièrement bien adapté pour l'étude dynamique du photosensibilisateur PPME libre et encapsulé dans les liposomes en milieu cellulaire.

A partir de là, il serait intéressant de pouvoir étendre le champ d'application du dispositif MMM aux échantillons tissulaires épais. Néanmoins, ceci nécessite de reconsidérer le système de détection. En effet, comme nous l'avons vu au paragraphe I.2.3, les phénomènes de diffusion auront un impact important sur les images d'intensité de fluorescence enregistrées avec le système de détection actuel. L'idéal également serait de pouvoir appliquer la technique à des échantillons tissulaires mais dans ce cas il faudrait utiliser un ensemble de détection moins sensible aux effets de diffusion de la lumière au sein des échantillons épais. Cette alternative a été développée par deux équipes :

L'équipe de K.H. Kim et al. a mis en place un système de tube de photomultiplicateurs à multianodes (appelé MAPMT, l'anode est segmentée en une grille de 8x8 pixels, Hamamatsu) [23] couplée à un disque de microlentilles (schéma du montage sur la Figure I.4-1).

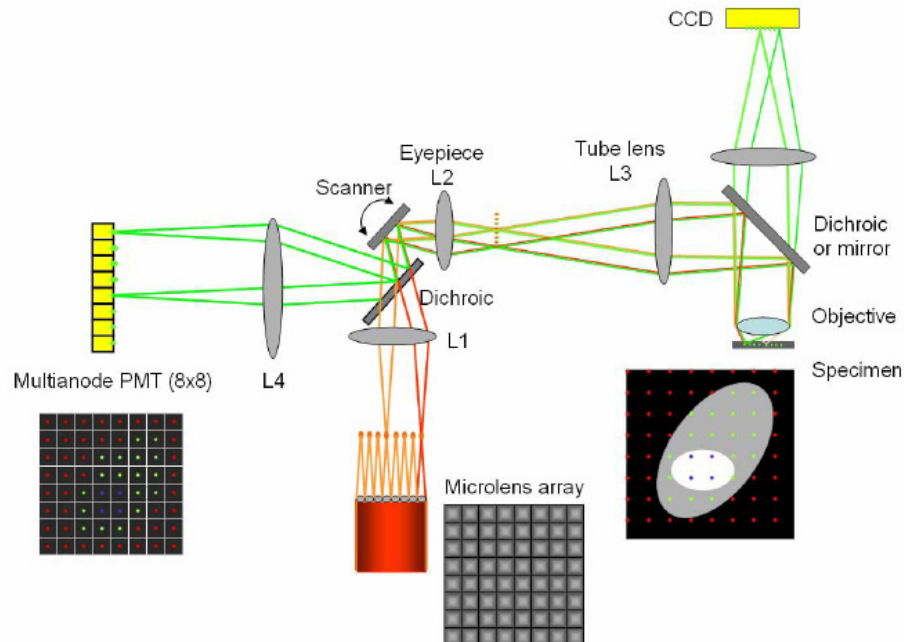


Figure I.4-1 : Schéma du microscope multiphotons multipoints mis en place par K.H. Kim et al. [23] utilisant le système MAPMT : les faisceaux d'excitation sont représentés en orange et l'émission en vert, le disque de microlentille divise le faisceau incident en matrice de 8x8 ; L1, L2 et L3 sont des lentilles et la fluorescence peut être détectée, soit par le système MAPMT, soit par une caméra CCD.

L'équipe de S. Kumar et al. [25] a utilisé une barrette de 16 photomultiplicateurs avec un système générant une ligne de 16 points d'excitation (ce système optique repose sur le même principe que notre ensemble générant la matrice d'excitation 8x8), le schéma est présenté sur la Figure I.4-2 :

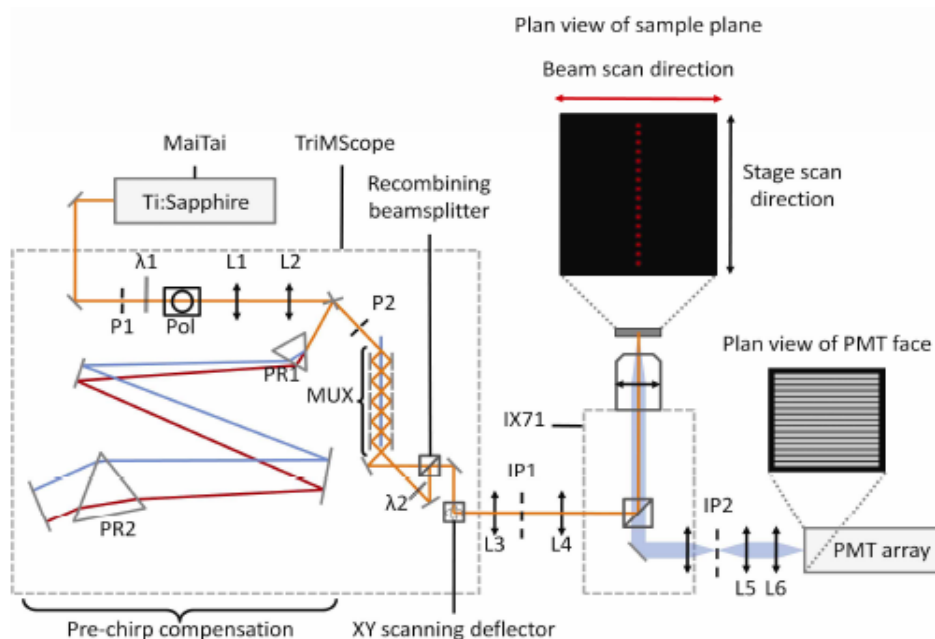


Figure I.4-2 : Schéma du montage de S. Kumar et al. [25], l'excitation est représentée en orange et l'émission en bleu, P1 et P2 sont des trous de filtres, λ_1 et λ_2 des lames demi-onde, L1-L6 des lentilles, PR1 et PR2 des prismes ; le MUX génère la ligne de 16 points d'excitation.

La différence entre les images d'intensité de fluorescence enregistrées avec une caméra CCD et celles acquises avec un ensemble de MAPMT est illustrée sur la Figure I.4-3. On constate que les phénomènes de diffusion dégradent de manière conséquente la résolution spatiale des images de fluorescence avec la profondeur de pénétration dans l'échantillon (comme on peut le voir sur la Figure I.4-3 a-c). Le système de détection MAPMT a permis d'améliorer la résolution spatiale mais il présente encore certains inconvénients. Les détecteurs sont notamment peu sensibles dans le rouge (ceci est dû à la composition des cathodes), les points d'excitation doivent être espacés d'une certaine distance qui dépend de l'objectif (champ d'observation et ON) et le signal de fluorescence émis par l'échantillon doit être dé-scanné. De plus, ce système ne permet pas d'enregistrer des images FLIM.

La barrette de 16 PMT [25], quant à elle, a été utilisée pour des mesures de comptage de photons uniques (TCSPC) sur des cellules adhérentes. Son efficacité n'a pas encore été vérifiée sur des échantillons épais.

Dans notre cas, nous pourrions envisager d'adapter le système MAPMT à notre dispositif MMM puisque l'anode est un réseau de 8x8 zones de détection ce qui n'est pas le cas des barrettes de PMT qui sont, pour l'instant, limitées à un nombre de 16 photomultiplicateurs en ligne.

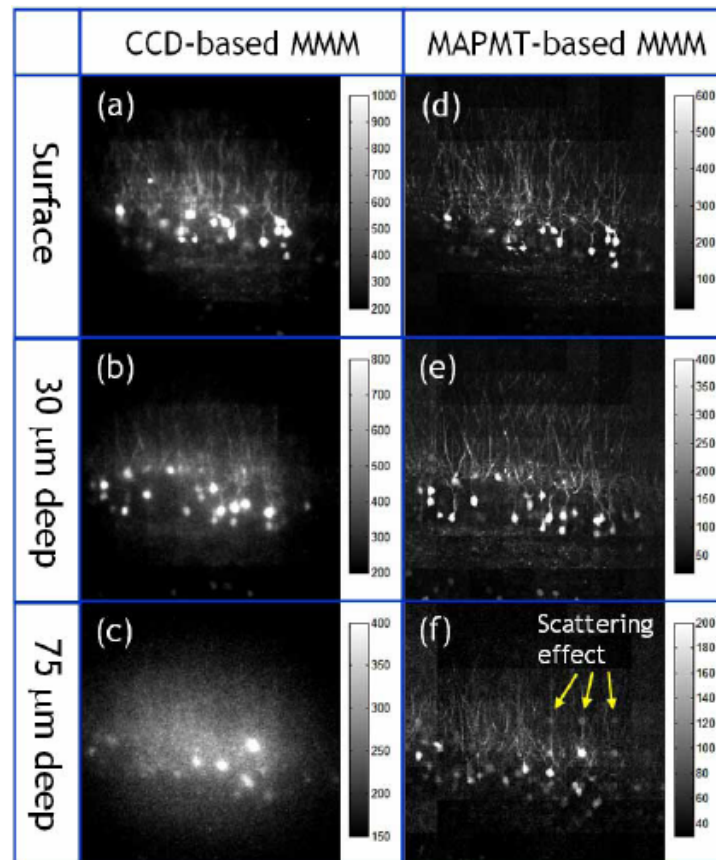


Figure I.4-3 : Images extraites de l'article de K.H. Kim et al. [23] : Images d'intensité de fluorescence de neurones exprimant la GFP (mesures effectuées ex vivo sur un cerveau de souris), (a)-(c) acquises avec un MMM couplé à une caméra CCD, (d)-(f) MMM couplé à un système de détection MAPMT à différentes profondeurs (à la surface de l'échantillon, à 30 μm et 70 μm de profondeur ; avec un objectif $\times 20$ à immersion à eau et une ON de 0.95, excitation à 890 nm).

D'autres utilisations sont envisageables pour notre système MMM. Comme nous l'avons rappelé dans le Tableau I.1-1, l'un des avantages de notre système optique est sa flexibilité. L'écart entre les points d'excitation est modulable et on peut aisément modifier la configuration de notre système pour éventuellement n'utiliser qu'un seul des deux montages. En positionnant un miroir « flip-flap » juste à la sortie du premier système diviseur, on intercepte la lignée de huit points créée pour la diriger vers l'entrée du microscope.

Ainsi, il est tout à fait envisageable de faire de la microscopie de fluorescence en mode FCS (spectroscopie de corrélation de fluorescence) en huit points de l'échantillon, puisque, dans le cas où uniquement huit points de la matrice d'excitation sont utilisés, on dispose alors d'une puissance moyenne d'environ 40 mW par points.

Le but serait de suivre par FCS la diffusion de molécules fluorescentes (marqueurs, médicaments, biopolymères) simultanément en divers endroits d'une même cellule (membrane, cytoplasme, noyau). Cependant, ce genre d'application nécessite de mettre en place un nouveau système de détection adapté à la FCS sur le port de sortie libre de notre microscope. Bien évidemment, l'idéal serait de pouvoir imager, dans un premier temps, l'échantillon puis de réaliser des mesures FCS sur les zones d'intérêt à étudier. Pour ce faire, il faut disposer d'un système de détection capable de basculer, du mode « imagerie de fluorescence multipoints », au mode « mesure de FCS ». Ce système de détection doit donc être résolu spatialement, posséder une bonne sensibilité, un fort rendement d'efficacité et réduire au maximum le bruit de lecture.

Une caméra EMCCD (electron multiplying CCD) pourrait être tout à fait adaptée à notre cas.

Une étude complète, sur la compatibilité de cet instrument avec les mesures FCS, a déjà été réalisée par l'équipe de P. Schwille [52] qui a montré qu'avec deux points d'excitation, la caméra EMCCD était tout à fait adaptée aux mesures de FCS.

D'autres essais avaient déjà été réalisés pour détecter un signal FCS provenant au maximum de quatre points d'excitation différents [53, 54]. Mais le type de détection utilisé (quatre fibres optiques et des photodiodes à avalanche individuelles) ne peut être appliqué à notre dispositif.

Quoi qu'il en soit, l'ajout de cette modalité sur notre système sera facilement réalisable et n'entraînera pas de trop lourdes modifications sur le système actuel. Nous pourrons alors réaliser successivement des images d'intensité et de durée de vie de fluorescence sur un échantillon et des mesures complémentaires de FCS.

Annexe A : Matériels et Méthodes

Annexe A 1 : Courbes de réponse de la lame séparatrice du système optique

La lame séparatrice du système permettant de générer la matrice d'excitation possède un coefficient de réflexion R [%] de 49,5 pour le domaine 720 - 900 nm (Figure A-1 A).

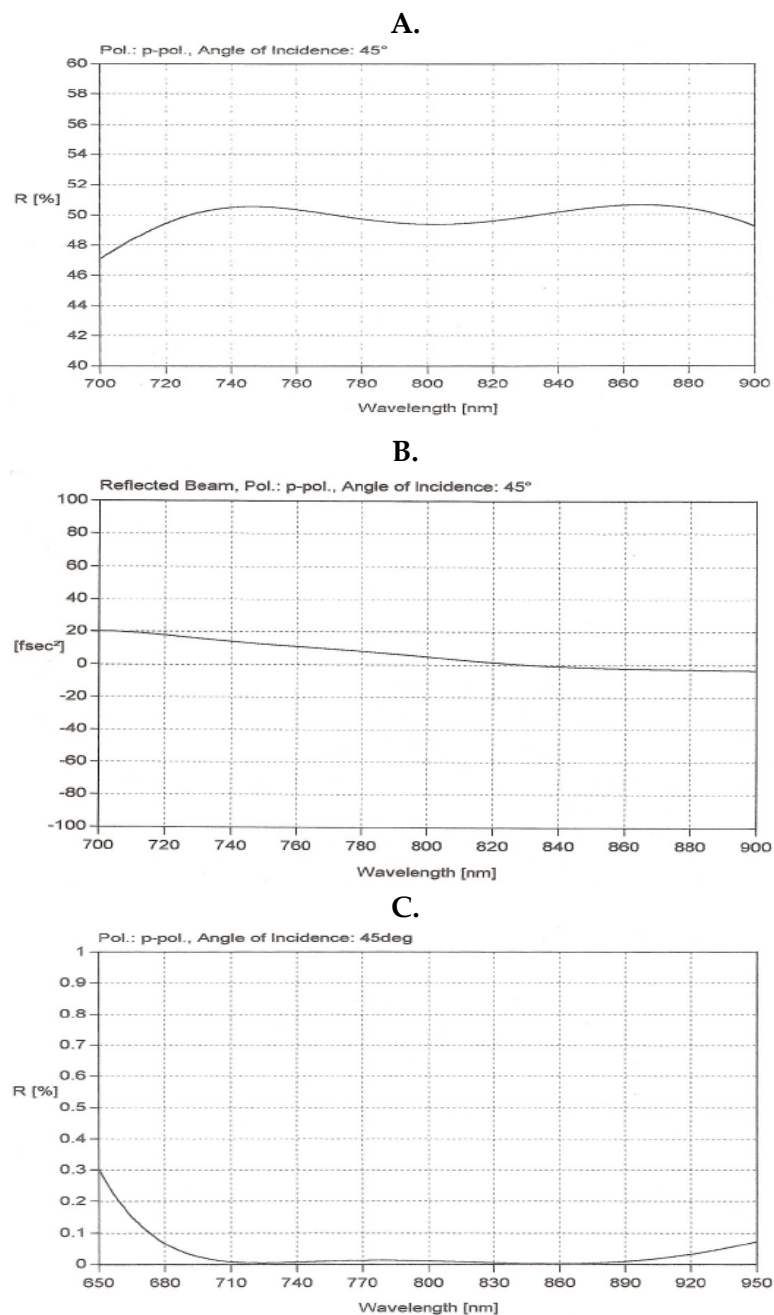


Figure A-1 : Courbes de réponse de la lame 50/50 : **A.** Coefficient de réflexion en fonction de la longueur d'onde pour un faisceau P-polarisé avec un angle d'incidence de 45 °, **B.** Courbe d'élargissement temporel de l'impulsion après passage dans la lame séparatrice, **C.** Réflectivité de la couche anti relet pour un faisceau P-polarisé avec un angle d'incidence de 45°.

La Figure A-1 B donne l'effet d'un passage dans la lame séparatrice sur la largeur temporelle de l'impulsion laser. On constate que l'élargissement de la durée de l'impulsion est négligeable. De plus, le traitement anti-reflet de la deuxième face de la lame est optimum pour des longueurs d'onde comprises entre 710 nm et 890 nm (Figure A-1 C).

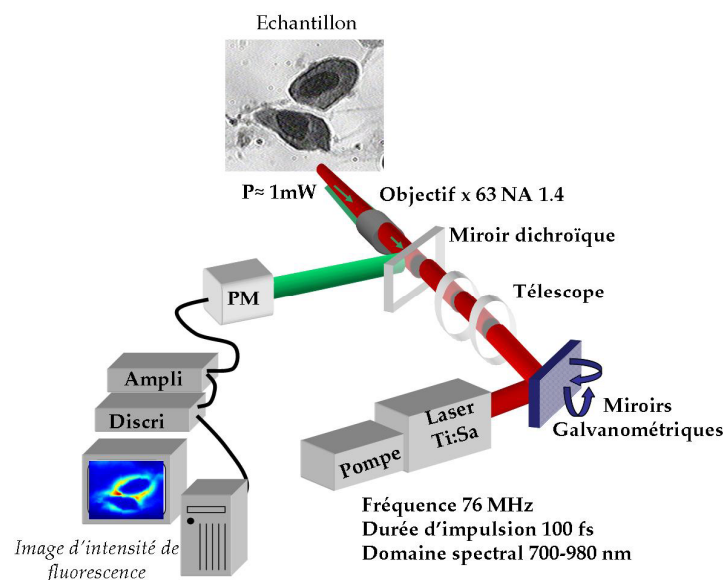
Annexe A 2 : Montage IDEFIX (Imagerie de Dynamique d'Émission de Fluorescence Intracellulaire sous excitation à X photons)

Montage optique

Il s'agit d'un dispositif de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons, qui permet d'acquérir des images d'intensité de fluorescence résolues temporellement (Figure A-2).

La source d'excitation est identique à celle utilisée pour le montage MMM : laser solide avec un cristal titane:saphir (Mira 900, Coherent) pompé par un laser Nd:YVO₄ (Verdi, Coherent). Il délivre des impulsions d'environ 100 fs de largeur temporelle avec une cadence de 76 MHz accordable de 700 à 980 nm. La puissance de sortie est proche de 800 mW mais seuls 10% sont utilisés pour le dispositif IDEFIX.

Le balayage du faisceau sur l'échantillon est assuré par des miroirs galvanométriques. Le faisceau d'excitation est imagé dans le plan focal arrière de l'objectif (x 63, NA = 1.4) via un télescope. La fluorescence émise en retour est collectée par le même objectif et est imagée sur le système de détection via un miroir dichroïque qui sépare l'excitation résiduelle et l'émission.



Imagerie résolue en temps

L'acquisition des images de durée de vie de fluorescence est réalisée sur ce montage par comptage de photons uniques (méthode TCSPC).

Ajustement des durées de vie

Le traitement de ces données est effectué soit par la méthode MLE (Maximum Likelihood Estimator) soit par la méthode multiexponentielle pour une meilleure précision. La première est particulièrement bien adaptée pour l'imagerie de fluorescence : elle permet d'obtenir extemporellement une estimation de la durée de vie moyenne de la fluorescence collectée. Cette méthode s'appuie sur un ajustement monoexponentiel des données en s'affranchissant du courant d'obscurité [55].

Dans le cas de déclin multiexponentiels, il est préférable d'utiliser a posteriori la deuxième méthode. Celle-ci donne chacune des composantes du déclin de fluorescence avec leur poids respectifs après déconvolution de la fonction d'appareil et soustraction du bruit de fond. L'ajustement est alors optimisé par une approche probabiliste.

Annexe A 3 : Préparation des échantillons biologiques

PPME solubilisé dans des liposomes

Une concentration x de PPME dissout dans l'éthanol est ajoutée à la solution de liposomes (petites vésicules unilamellaires de Dimyristoil-L- α phosphatidyl choline ou DMPC) : la concentration finale d'éthanol ne doit pas dépasser 5%. Pour un rapport $[DMPC]/[PPME] = 135$ à 26°C, le PPME est totalement intégré dans la bicouche des liposomes sous forme monomérique. Au delà de ce rapport, le PPME ne peut plus s'intégrer sous monomérique dans la bicouche.

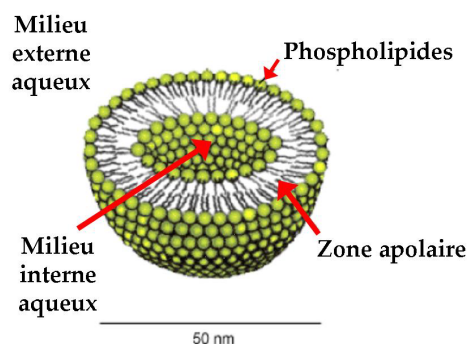


Figure A-3 : Schéma d'un liposome

Culture cellulaire

La lignée cellulaire HCT 116 a été fournie par l'équipe du laboratoire de Spectroscopie Biomédicale de Liège. Celle-ci est maintenue en culture dans du milieu de type McCoy enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine et 1% d'un mélange pénicilline-streptomycine. La sous-culture est effectuée au [1 :10]. Pour les acquisitions en imagerie de fluorescence, les cellules sontensemencées dans des chambres de culture compartimentées sur lamelle de verre (Lab-Tek coverglass II, Nunc).

Les cellules sont incubées pendant 12 h avec 10 μ M de photosensibilisateur PPME à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂ à l'abri de la lumière. Le même protocole est appliqué pour le PPME solubilisé dans les liposomes.

Références

1. Diels, J.C. and W. Rudolph, *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*, A. Press, Editor. 1996: San Diego.
2. Kim, K.H., C. Buehler, and P.T.C. So, *High-speed, two-photon scanning microscope*. *Applied Optics*, 1999. **38**(28).
3. Iyer, V., B.E. Losavio, and P. Saggau, *Compensation of spatial and temporal dispersion for acousto-optic multiphoton laser-scanning microscopy*. *J Biomed Opt*, 2003. **8**(3): p. 460-71.
4. Reddy, G.D. and P. Saggau, *Fast three-dimensional laser scanning scheme using acousto-optic deflectors*. *J Biomed Opt*, 2005. **10**(6): p. 064038.
5. Zeng, S., et al., *Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism*. *Opt Lett*, 2006. **31**(8): p. 1091-3.
6. Kobayashi, M., et al., *Time-gated imaging for multifocus second-harmonic generation microscopy*. *Review of scientific instruments*, 2005. **76**(073704).
7. Egner, A., S. Jakobs, and S.W. Hell, *Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(6): p. 3370-5.
8. Egner, A., V. Andresen, and S.W. Hell, *Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment*. *J Microsc*, 2002. **206**(Pt 1): p. 24-32.
9. Grant, D.M., et al., *Optically sectioned fluorescence lifetime imaging using a Nipkow disk microscope and a tunable ultrafast continuum excitation source*. *Opt Lett*, 2005. **30**(24): p. 3353-5.
10. Bewersdorf, J. and S.W. Hell, *Multifocal Multi-photon Microscopy*. *Optics Letters*, 1998. **23**: p. 655-57.
11. Bewersdorf, J., A. Egner, and S.W. Hell, *Multifocal multiphoton microscopy*, in *Handbook of biological confocal microscopy*, B. Pawley, Editor. 2006, Springer Science; Business Media: New-York.
12. Egner, A. and S.W. Hell, *Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton microscopy*. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 2000. **17**(7): p. 1192-201.
13. Shafer, D., *Gaussian to flat-top intensity distribution lens*. *Opt. Laser Technol.*, 1982. **14**: p. 159:160.
14. Buist, A.H., et al., *Real Time Two-photon Absorption Microscopy using Multipoint excitation*. *Journal of Microscopy*, 1998. **192**: p. 217-226.
15. Sacconi, L., et al., *Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element*. *Opt Lett*, 2003. **28**(20): p. 1918-20.
16. Fittinghoff, D.N. and J.A. Squier, *Time-decorrelated multifocal array for multiphoton microscopy and micromachining*. *Optics Letters*, 2000. **25**: p. 1213-15.
17. Fittinghoff, D.N., P.W. Wiseman, and J.A. Squier, *Widefield multiphoton and temporally decorrelated multifocal multiphoton microscopy*. *Optics Express*, 2000. **7**: p. 273-279.
18. Fricke, M. and T. Nielsen, *Two-dimensional imaging without scanning by multifocal multiphoton microscopy*. *Appl Opt*, 2005. **44**(15): p. 2984-8.
19. Lévêque-Fort, S., et al., *Fluorescence lifetime imaging with a multifocal two-photon microscope*. *Optics letter*, 2004. **29**: p. 2884-2886.
20. Nielsen, T., et al., *High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy*. *J Microsc*, 2001. **201**(Pt 3): p. 368-76.
21. Fujita, K., et al., *Confocal multipoint multi-photon excitation microscope with microlens and pinhole arrays*. *Opt. Commun.*, 2000. **174**: p. 7-12.
22. Qu, J., et al., *Temporally and spectrally resolved sampling imaging with a specially designed streak camera*. *Opt Lett*, 2006. **31**(3): p. 368-70.
23. Kim, K.H., et al., *Multifocal multiphoton microscopy based on multianode photomultiplier tubes*. *Optics Express*, 2007. **15**(18).
24. Straub, M. and S.W. Hell, *Fluorescence lifetime three-dimensional microscopy with picosecond precision using a multifocal multiphoton microscope*. *Applied Physics Letters*, 1998. **73**(13).

25. Kumar, S., et al., *Multifocal multiphoton excitation and time correlated single photon counting detection for 3-D fluorescence lifetime imaging*. Optics Express, 2007. **15**(20).
26. Straub, M., et al., *Live cell imaging by multifocal multiphoton microscopy*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(10): p. 726-34.
27. David, V., A. Krueger, and P. Feru, *Dispersion compensation sharpens multiphoton microscopy*. Laser Focus World, 2007.
28. Guiot, E., *Microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons : applications à des études de corrélations et de déclins de fluorescence en milieu biologique*. 2001, Université Paris XI: Orsay.
29. Cole, M.J., *Fluorescence Lifetime Imaging for Biomedical Applications*. 2000, University of London Imperial college of Science, Technology and Medicine.
30. Webb, S.E.D., *Development and Application of Widefield Fluorescence Lifetime Imaging*, in *Imperial College of Sciences, Technology and Medicine*. 2003, University of London: London.
31. Wang, X.F., et al., *A 2-dimensional fluorescence lifetime imaging system using a gated image intensifier*. Applied Spectroscopy, 1991. **45**(3): p. 360-366.
32. Connelly, J.P., et al., *Time-resolved fluorescence imaging of photosensitizer distributions in mammalian cells using a picosecond laser line-scanning microscope*. Journal of Photochemistry and Photobiology A-chemistry, 2001. **142**(2-3): p. 169-175.
33. Lee, K.C., et al., *Application of the stretched exponential function to fluorescence lifetime imaging*. Biophys J, 2001. **81**(3): p. 1265-74.
34. Mertz, J., *Molecular photodynamics involved in multiphoton excitation fluorescence microscopy*. European Physical Journal D 1998. **3**: p. 53-66.
35. Jureller, J.E., Y.H. Kim, and N.F. Scherer, *Stochastic scanning multiphoton multifocal microscopy*. Optics Express, 2006. **14**(8).
36. Sharman, K.K., et al., *Error Analysis of the Rapid Lifetime Determination Method for Double-Exponential Decays and New Windowing Schemes*. Anal. Chem., 1999. **71**: p. 947-952.
37. Xu, C. and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross-sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. Journal of Optical Society of America B 1996. **13**(3): p. 481-491.
38. So, P.T., et al., *Two-photon excitation fluorescence microscopy*. Annu Rev Biomed Eng, 2000. **2**: p. 399-429.
39. Lakowicz, J.R., et al., *Time-resolved fluorescence spectroscopy and imaging of DNA labeled with DAPI and Hoechst 33342 using three-photon excitation*. Biophys J, 1997. **72**(2 Pt 1): p. 567-78.
40. Benda, A., et al., *Fluorescence lifetime correlation spectroscopy combined with lifetime tuning: new perspectives in supported phospholipid bilayer research*. Langmuir, 2006. **22**(23): p. 9580-5.
41. Steenkeste, K., et al., *Ex vivo fluorescence imaging of normal and malignant urothelial cells to enhance early diagnosis*. Photochem Photobiol, 2007. **83**(5): p. 1157-66.
42. Delanaye, L., et al., *Physical and chemical properties of pyropheophorbide-a methyl ester in ethanol, phosphate buffer and aqueous dispersion of small unilamellar dimyristoyl-L-alpha-phosphatidylcholine vesicles*. Photochem Photobiol Sci, 2006. **5**(3): p. 317-25.
43. Matroule, J.Y., et al., *Pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photosensitization activates transcription factor NF-kappaB through the interleukin-1 receptor-dependent signaling pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 2988-3000.
44. Matroule, J.Y., et al., *Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization*. Oncogene, 2001. **20**(30): p. 4070-84.
45. Sun, X. and W.N. Leung, *Photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human lung carcinoma cancer cell: efficacy, localization and apoptosis*. Photochem Photobiol, 2002. **75**(6): p. 644-51.
46. Jablonski, A., *Zeitung of physik*, 1935. **94**(38).
47. Foote, C.S., *Definition of Type I and type II photosensitized oxidation*. Photochem Photobiol, 1991. **54**(5): p. 659.
48. Morgan, J. and A.R. Oseroff, *Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **49**(1-2): p. 71-86.
49. McCaughan, J.S., Jr., *Photodynamic therapy: a review*. Drugs Aging, 1999. **15**(1): p. 49-68.
50. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(12): p. 889-905.

51. Baudin, X., *Diagnostic et thérapie par imagerie de fluorescence multimodale*. 2006.
52. Burkhardt, M. and P. Schwille, *Electron multiplying CCD based detection for spatially resolved fluorescence correlation spectroscopy*. *Optics express*, 2006. **14**(12): p. 5013-5020.
53. Blom, H., et al., *Parallel fluorescence detection of single biomolecules in microarrays by a diffractive-optical-designed 2 x 2 fan-out element*. *Appl Opt*, 2002. **41**(16): p. 3336-42.
54. Gosch, M., et al., *Parallel single molecule detection with a fully integrated single-photon 2x2 CMOS detector array*. *J Biomed Opt*, 2004. **9**(5): p. 913-21.
55. Pernot, P., et al., *Comparison of average lifetime estimators for time resolved fluorescence lifetime imaging*. en préparation.

PARTIE II. LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE AU SERVICE DU DIAGNOSTIC PRECOCE DE CANCER ...

II.1.	Problématique de l'étude	75
II.2.	Le modèle d'étude : le cancer du col de l'utérus	75
II.2.1.	Anatomie du col de l'utérus	75
II.2.2.	Pathologie	77
II.2.3.	Le diagnostic.....	79
II.2.4.	La coloration du matériel cytologique.....	81
II.3.	La microscopie de fluorescence pour améliorer la sensibilité du diagnostic ..	82
II.3.1.	Propriétés photophysiques des colorants du Papanicolaou et des fluorophores cellulaires endogènes	82
II.3.2.	Identification de la fluorescence des lames cytologiques du col utérin.....	88
II.3.2.1.	<i>Cellules normales versus cellules tumorales.....</i>	<i>88</i>
II.3.2.2.	<i>Conclusion</i>	<i>100</i>
II.4.	Validation de la méthode sur les lames atypiques	101
	Annexe B : Matériels et Méthodes	105
	Références.....	109

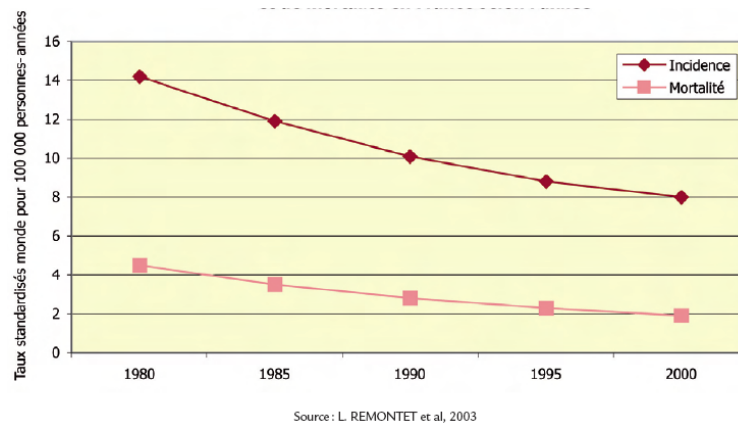
II.1. Problématique de l'étude

De plus en plus de technologies optiques innovantes sont intégrées pour le diagnostic précoce et non invasif des cancers. Notamment, comme nous l'avons vu dans l'introduction, des techniques utilisant la fluorescence sont tout à fait adaptées à l'étude non destructive des cellules ou des tissus biologiques. Ainsi, dans ce contexte, une méthode utilisant la microscopie de fluorescence (intensité, spectre et durée de vie de fluorescence) a été mise en place au laboratoire pour améliorer la sensibilité du diagnostic précoce des cancers urothéliaux [1].

Dans le cadre de ce travail, nous avons mené une étude similaire pour diagnostiquer précocement les cancers du col de l'utérus. Cette étude a pour but de montrer qu'il est possible d'étendre l'utilisation de la microscopie de fluorescence pour le diagnostic précoce à différents types de cancer.

II.2. Le modèle d'étude : le cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus est, avec celui du sein, le plus fréquent chez la femme. Il tue chaque année dans le monde près de 300 000 femmes et il est classé au 3^{ème} rang des cas de cancers chez la femme en Europe [2]. Pourtant, cette maladie peut-être guérie dans 100% des cas si le diagnostic est fait précocement et de manière fiable. Le combat réside donc dans une organisation efficace du dépistage. En effet, on peut constater que depuis les années 80, la mise en place de programmes de dépistage, a permis de réduire l'incidence¹ du cancer du col de l'utérus de près de 50% (Graphique II.2-1).



Graphique II.2-1 : Incidence et taux de mortalité du cancer du col de l'utérus au cours des 20 dernières années.

Généralement, quelle qu'en soit la cause, tout type de cancer passera nécessairement par le stade de lésions précancéreuses (appelées CIN), laissant donc une fenêtre d'opportunité importante pour la prévention du développement d'un cancer dans la mesure où la patiente se soumet à un dépistage régulier. Par exemple, le cancer invasif du col utérin met en moyenne 15-20 ans à se développer après la persistance d'une infection virale de type Human Papilloma Virus ou HPV [3]. En France, le dépistage du cancer du col de l'utérus repose sur un test spécifique : le frottis cervico-utérin (ou FCU qui correspond à un prélèvement cellulaire au niveau de la zone signalée en rouge sur la Figure II.2-1 du col de l'utérus).

II.2.1. Anatomie du col de l'utérus

Le col utérin est constitué de deux parties : l'exocol et l'endocol séparés par la zone de transition, encore appelée zone de jonction (Figure II.2-1).

¹ Incidence : terme utilisé pour décrire la fréquence d'une maladie dans une population

L'exocol est revêtu d'un épithélium malpighien (pavimenteux stratifié) non kératinisé² (ces caractéristiques sont données dans l'Annexe B1 p.105).

L'endocol ou canal endocervical est revêtu d'un épithélium glandulaire simple mucosécrétant. Cet épithélium s'invagine dans le chorion ce qui forme des glandes endocervicales.

La zone de jonction (Figure II.2-1) entre l'épithélium malpighien exocervical et l'épithélium glandulaire endocervical se fait de manière abrupte. Sous l'influence de facteurs hormonaux, on observe une tendance physiologique à l'éversion de l'épithélium glandulaire. Cette zone éversée va subir une métaplasie malpighienne, c'est à dire un remplacement de l'épithélium glandulaire par un épithélium malpighien d'architecture normale. Ceci se traduit par des modifications morphologiques des cellules qui sont visuellement reconnaissables en tenant compte du contexte.

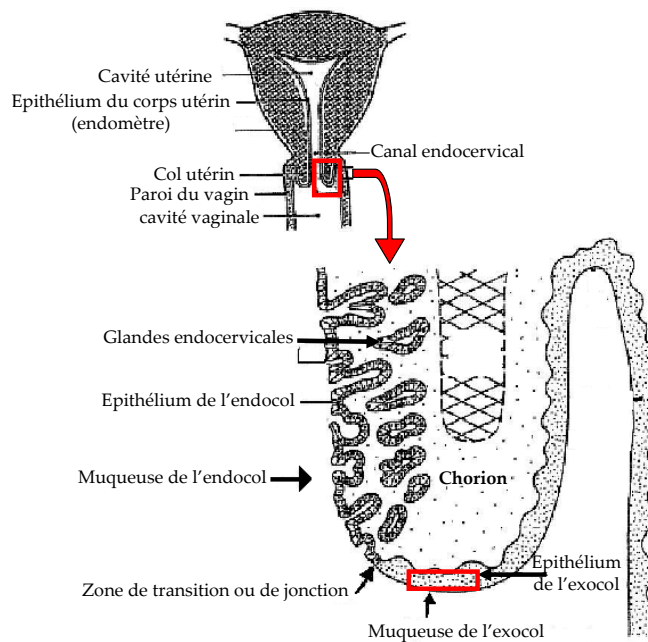


Figure II.2-1 : Schéma du col utérin

Histologie et cytologie

Sur un plan anatomo-pathologique, l'exocol est recouvert d'une muqueuse malpighienne pluristratifiée non kératinisée (voir Figure II.2-2) et l'endocol d'une muqueuse glandulaire.

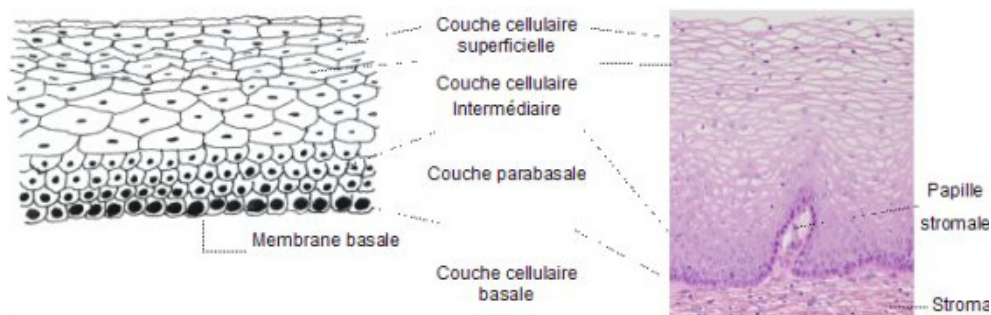


Figure II.2-2 : Coupe de tissu : Structure de l'exocol normal, épithélium pavimenteux stratifié (x 20) (zone localisée sur le schéma du col utérin par le rectangle rouge ; référence : <http://screening.iarc.fr>: « Coloscopie et Traitement de la néoplasie cervicale intraépithéliale. Manuel à l'usage des débutants »

² Epithélium malpighien non kératinisant : désigne un épithélium comportant plusieurs couches cellulaires, caractérisé par l'absence de kératinisation (processus au cours duquel les cellules s'enrichissent en kératine)

Ainsi, sur une lame de cytologie, plusieurs types de cellules seront observés: les plus nombreuses sont les cellules pavimenteuses de l'exocol (superficielles, intermédiaires, para-basales et basales), mais il y a aussi des cellules endocervicales (cellules de l'endocol, voir schéma Figure II.2-2) et des cellules endométriales (cellules de l'endomètre).

Pour pouvoir être analysées en microscopie par transmission, les lames sont colorées d'après le protocole de coloration de Papanicolaou. Les cellules pavimenteuses superficielles sont des cellules matures, avec un cytoplasme polygonal abondant, un petit noyau et une chromatine condensée (Figure II.2-3 A). Elles apparaissent rose-orangées. Les cellules intermédiaires ont un noyau plus grand que celui des cellules superficielles avec une chromatine moins dense et apparaissent bleutées (Figure II.2-3 B). Les cellules para-basales et basales sont des cellules immatures, petites, de forme ovale à ronde. Le noyau ressemble à celui des cellules intermédiaires (également de couleur bleutée, Figure II.2-3 C). On peut dire qu'en allant des couches basales vers les couches superficielles, la taille du cytoplasme s'agrandit et celle du noyau diminue (le rapport nucléocytoplasmique décroît).

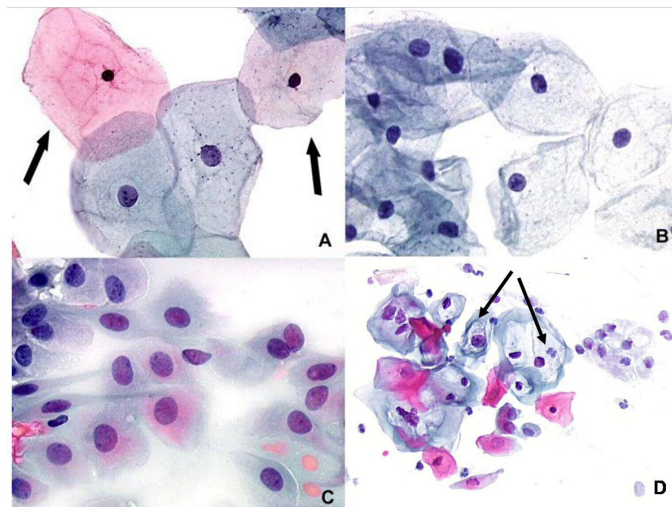


Figure II.2-3 : Photos de cytologies du col de l'utérus : A. cellules malpighiennes superficielles (fléchées), B. cellules intermédiaires, C. cellules parabasales, D. infection HPV des cellules pavimenteuses (cellules infectées signalées par une flèche)

Une infection HPV va engendrer des modifications morphologiques des cellules caractéristiques. Elle se traduit au niveau de la morphologie cellulaire par une zone périnucléaire optiquement vide, bordée par une densification cytoplasmique associée à une augmentation de la taille du noyau et éventuellement associée à l'apparition d'une binucléation (Figure II.2-3 D).

II.2.2. Pathologie

Les lésions précancéreuses

Les cancers du col utérin sont précédés par une série de modifications intraépithéliales qui constituent les lésions précancéreuses (William, 1888). Ces états préinvasifs se manifestent, du point de vue microscopique, par l'apparition d'atypies cellulaires (prolifération de cellules atypiques plus ou moins différenciées) et sont appelées : lésions intra-épithéliales de bas ou de haut grade, dysplasie ou CIN (nomenclature Bethesda, [4-6]). Elles commencent le plus souvent à la zone de jonction (Figure II.2-1) et s'étendent le long du canal endocervical et de l'exocol.

Les lésions dysplasiques se manifestent par une désorganisation de l'architecture de l'épithélium malpighien, une perte de la maturation ainsi que des atypies cytoplasmiques et nucléaires.

La sévérité des lésions est évaluée par la profondeur des anomalies cellulaires dans l'épithélium. Les lésions commencent par des modifications mineures (c'est à dire CIN I), progressent vers les CIN II, puis vers les CIN III (dysplasie sévère et carcinome in situ).

Néanmoins, cette évolution n'est pas toujours progressive et même dans certains cas, la lésion peut régresser. En effet, en l'absence de traitement, seulement 1% des CIN I progresseront vers un cancer invasif contre 10 à 15% des CIN II [7].

Au niveau de la cytologie, l'apparition de lésions est repérée selon des critères morphologiques bien précis, décrits ci-après :

- CIN I correspond à une lésion de bas grade et se traduit sur la cytologie par un noyau volumineux, 2 à 3 fois supérieur à la normale.
- CIN II correspond à une lésion de haut grade qui se traduit par des cellules intermédiaires et parabasales présentant un noyau volumineux, unique ou multiple, aux contours légèrement irréguliers et avec une chromatine moins homogène. Certains noyaux présentent un hyperchromatisme, d'autres une densification de la chromatine.
- CIN III correspond à une lésion de haut grade qui se traduit par une anisocaryose ; c'est à dire une nette augmentation du rapport nucléocytoplasmique, une chromatine mottée de répartition hétérogène. En général, on observe une aggravation des atypies nucléaires. Sur des lames avec une faible concentration cellulaire, les cellules tumorales se présenteront sous forme d'amas ou de grappes, contrairement aux cellules normales (ou saines, comme les cellules basales ou parabasales) qui seront isolées

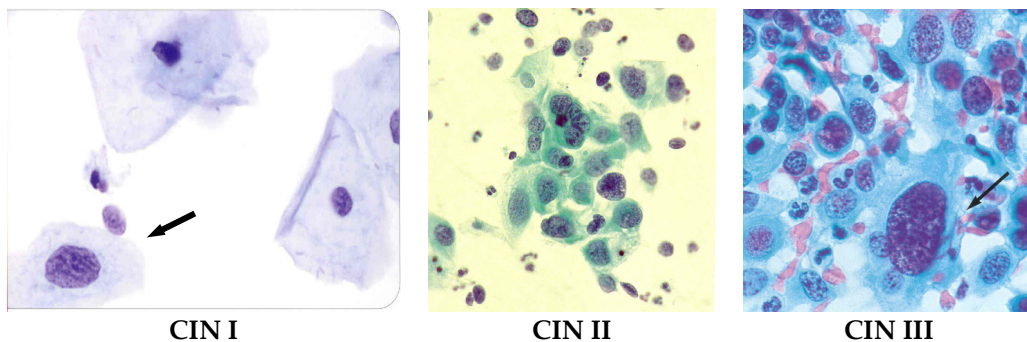


Figure II.2-4 : Cytologie du col utérin, morphologie des cellules présentant des atypies de type CIN I, CIN II et CIN III

Les carcinomes invasifs

Il existe deux principaux types de cancer du col utérin : le carcinome épidermoïde qui évolue à partir de l'épithélium de surface de l'exocol puis envahit le chorion cervical après avoir franchi la membrane basale (schéma de la Figure II.2-5) et l'adénocarcinome qui se développe à partir du revêtement glandulaire. Les carcinomes épidermoïdes (définition Annexe B 1) représentent environ 80% des lésions invasives [8].

On distingue :

- Le carcinome micro-invasif où il y a une rupture de la membrane basale et une invasion du stroma par les cellules malignes. Le potentiel métastatique de la lésion est encore limité.
- Le carcinome invasif qui peut être végétant ou ulcérant
- La phase d'extension avec une diffusion des métastases

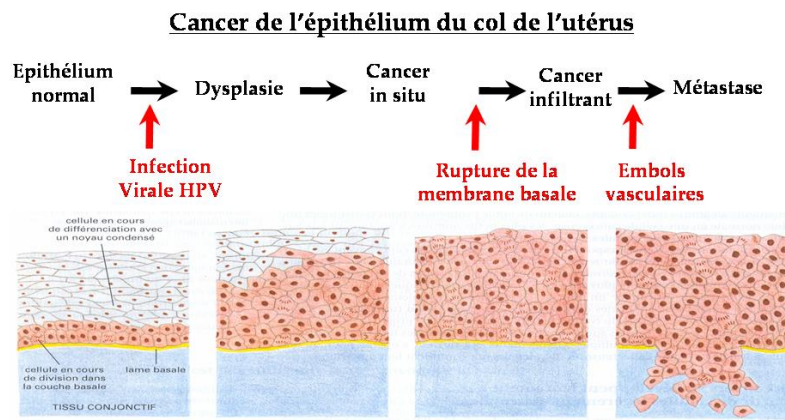


Figure II.2-5: Evolution du tissu tumoral du col de l'utérus [9]

Les Facteurs de risque

Un certain nombre de facteurs de risques liés au développement du cancer du col utérin et de ses précurseurs (états précancéreux) a été identifié suite à des études épidémiologiques : comme cela a déjà été mentionné précédemment, on peut citer l'infection due à certains types oncogènes du virus du papillome humain (HPV), les comportements sexuels, l'utilisation à long terme d'une contraception orale, le tabac et les carences alimentaires [10-13]. L'absence ou le mauvais suivi par dépistage cervico-vaginal est un facteur de risque supplémentaire.

De nombreuses études ont été menées sur l'infection de type HPV, notamment, sur ses mécanismes d'action, les techniques de détection et les thérapies type vaccin. En effet, il a été montré que plus de 95% des cas de cancers du col utérin sont HPV positifs et 75 à 95% des CIN de haut grade sont HPV positifs [7, 14-17]. Heureusement, 95% des infections HPV guérissent spontanément, sans développement de cancer du col.

L'HPV est un virus à ADN double brin qui se réplique exclusivement dans les épithéliums malpighiens. Environ 80 sous-types du virus sont impliqués dans les infections génitales, dont un tiers est à haut risque oncogénique car associé avec la progression tumorale des cancers du col [18].

A priori, l'infection se déclare d'abord au niveau des cellules basales ou para-basales de l'épithélium qui représentent la seule couche cellulaire en division. L'ADN viral y est maintenu sous forme circulaire dans le noyau des cellules infectées. Lorsque le génome viral est intégré au génome de la cellule hôte, l'expression de certaines protéines et la perte de contrôle de la croissance peuvent interrompre le cycle normal de différenciation de l'épithélium, ce qui engendre le développement de dysplasies. Ces lésions précoces de bas grade finissent par envahir l'épithélium sur toute son épaisseur, la maladie peut ensuite traverser la membrane basale et évoluer vers un cancer invasif.

II.2.3. Le diagnostic

Idéalement, un test de dépistage doit avoir une bonne sensibilité³ et une bonne spécificité⁴, être fiable, facile à mettre en œuvre et relativement peu coûteux. Le test de dépistage du col utérin utilisé actuellement est le frottis. Il a deux fonctions : identifier les femmes dans un état pré-cancéreux qui ont besoin d'un traitement et les populations à risque atteintes d'une infection virale HPV oncogénique. Ce test doit être systématique et pratiqué régulièrement. En effet, les lésions précancéreuses sont généralement insidieuses et ne donnent souvent aucun symptôme. C'est un examen simple, efficace et indolore. Il consiste à prélever des cellules du col de l'utérus afin qu'elles soient examinées par microscopie en transmission ce qui permet de détecter très tôt les cellules anormales (Annexe B 2).

³ Sensibilité : proportion des patientes ayant la maladie et identifiée correctement comme étant positif.

⁴ Spécificité : proportion des patientes n'ayant pas la maladie et identifiée correctement comme étant négatif

En cas d'infection HPV, on peut augmenter la performance de l'examen cytologique avec un test ADN, qui permettra de déterminer le type de virus HPV. Dans les études comparatives, le test HPV a une meilleure sensibilité pour les hauts grades CIN [19, 20] (CIN II, CIN III) que la cytologie.

Le dépistage des cancers suit la procédure suivante (résumé sur la Figure II.2-6) : on commence par un examen cytologique FCU ; si celui-ci révèle la présence d'anomalies ou une lésion inflammatoire, on procède à un diagnostic colposcopique (observation *in situ*). Cependant la colposcopie ne permet pas de faire la distinction entre les changements induits par l'infection HPV et une métaplasie des couches superficielles [21]. Toute zone anormale est biopsiée car seule l'histologie confirme le diagnostic. Ensuite, selon le grade et le stade de la lésion, on adoptera une stratégie thérapeutique adaptée.

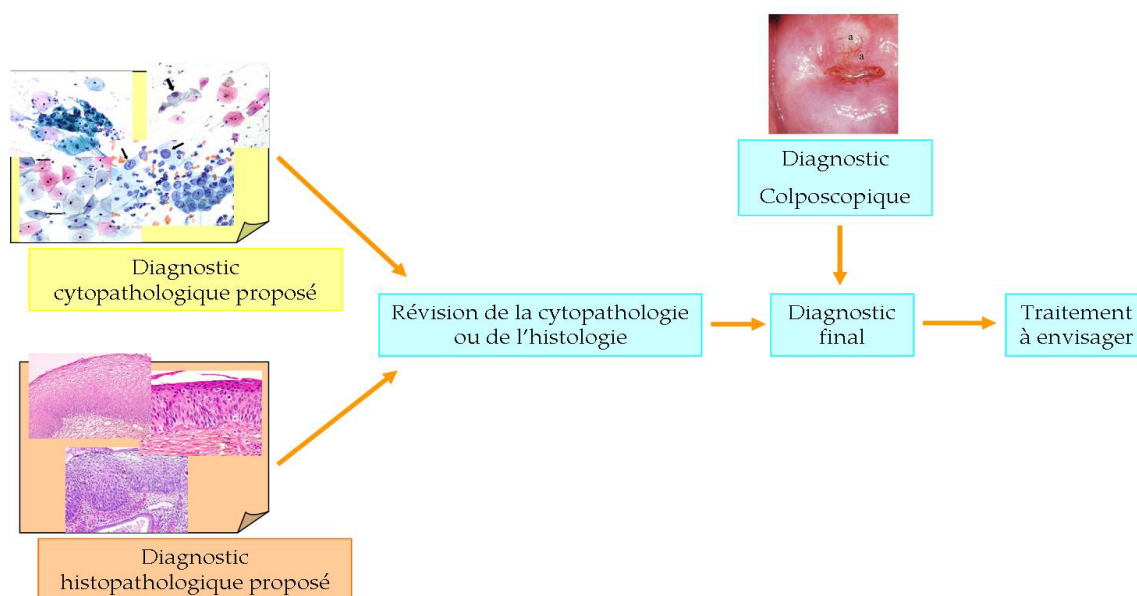


Figure II.2-6 : Schéma résumant le déroulement d'un dépistage type du col de l'utérus en France

L'avantage de la cytologie, comparée à la biopsie, est que les examens répétitifs ne perturbent pas les lésions étudiées alors que les biopsies nécessitent un prélèvement sur toute l'épaisseur de l'épithélium ce qui induit une inflammation. Néanmoins, la cytologie ne permet pas de détecter parfaitement des altérations qui peuvent avoir lieu dans les couches profondes de l'épithélium. Une infection HPV latente des couches basales peut rester indétectable à la cytologie pendant des années.

Du point de vue de la reproductibilité, la cytologie et l'histopathologie sont identiques [22] sauf pour les états pré-cancéreux de bas grade. Le problème commun aux deux techniques est l'évaluation subjective des critères morphologiques qui permettent d'établir le diagnostic. Les performances du test vont donc dépendre de la personne qui pratique l'examen des lames de cytologie. D'où l'intérêt de développer actuellement des tests qui utilisent des critères d'évaluation fiables, reproductibles et non subjectifs.

Nouvelles techniques de diagnostic

Les avancées réalisées en biologie moléculaire et dans les techniques d'imagerie pourraient être la clé pour diminuer l'incidence des cancers. Des systèmes comme les microendoscopes sont de plus en plus utilisés. Ce genre de technologie est particulièrement bien adapté au col de l'utérus puisque c'est un organe facile d'accès. De plus, ces systèmes répondent aux besoins des médecins dans le sens où ils peuvent être robustes et portables.

Différentes techniques ont été couplées à un endoscope ou à un colposcope : elles utilisent les propriétés de diffusion et d'absorption de la lumière de l'épithélium [23] ou de fluorescence des molécules endogènes des tissus [24-26]. Des molécules exogènes ont également été employées soit comme marqueurs spécifiques (nanocristaux fonctionnalisés avec des antigènes spécifiques de certains marqueurs moléculaires du cancer [27]) soit comme agents permettant d'augmenter la concentration de molécules fluorescentes naturellement présentes dans le tissu cervical comme l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) [28-30].

Dans ce dernier cas, le 5-ALA est utilisé comme précurseur pour la production au sein des cellules tumorales de la protoporphyrine IX dont la concentration augmente alors fortement. Ainsi, la détection et le traitement des lésions tumorales dans l'organe peuvent être effectués simultanément (PDT, dont les mécanismes d'actions sont décrits dans la partie I p.51).

Des techniques équivalentes ont également été investies sur des biopsies pour améliorer le diagnostic : elles sont basées sur la spectroscopie IR [31] ou la fluorescence endogène des tissus [32-35].

Néanmoins, ces différentes approches particulièrement prometteuses restent plus invasives et plus coûteuses que la FCU.

Sur la base des résultats obtenus dans la précédente étude réalisée au laboratoire sur les cytologies urinaires, nous nous sommes intéressés aux cytologies cervicales afin d'améliorer leurs performances.

II.2.4. La coloration du matériel cytologique

Les cellules du col utérin récupérées à l'aide d'une brosette, sont projetées sur des lames puis fixées et colorées selon le protocole de coloration de Papanicolaou.

Coloration selon le protocole de Papanicolaou

Le protocole de coloration des échantillons appelé Papanicolaou est une coloration pentachromique (détails donnés en Annexe B2). La première phase permet de colorer les noyaux avec une solution d'hématoxyline ce qui les fait apparaître en bleu violet foncé. La seconde étape correspond à la coloration cytoplasmique qui marque particulièrement bien les cellules mures et kératinisantes : l'orange G6 marque la kératine ; on verra alors les cellules hyperkératinisées apparaître orangées. La solution polychrome EA50 utilisée en dernière étape permet de différencier les cellules provenant de l'épithélium pavimenteux. Elle est composée de trois colorants : le brun de Bismarck (marque les protéines glycosylées), le vert lumière (marque le cytoplasme des cellules autres que les cellules superficielles), l'éosine Y (marque les structures cytoplasmiques type collagène des cellules superficielles desquamantes).

Selon l'affinité tinctoriale des cellules pour les deux colorants OG6 et EA50, on aura une coloration cytoplasmique différentielle :

- Cyanophile apparaît bleu ou vert clair
- Eosinophile apparaît rose ou rose orangé
- Orangeophile : orange ou rouge.

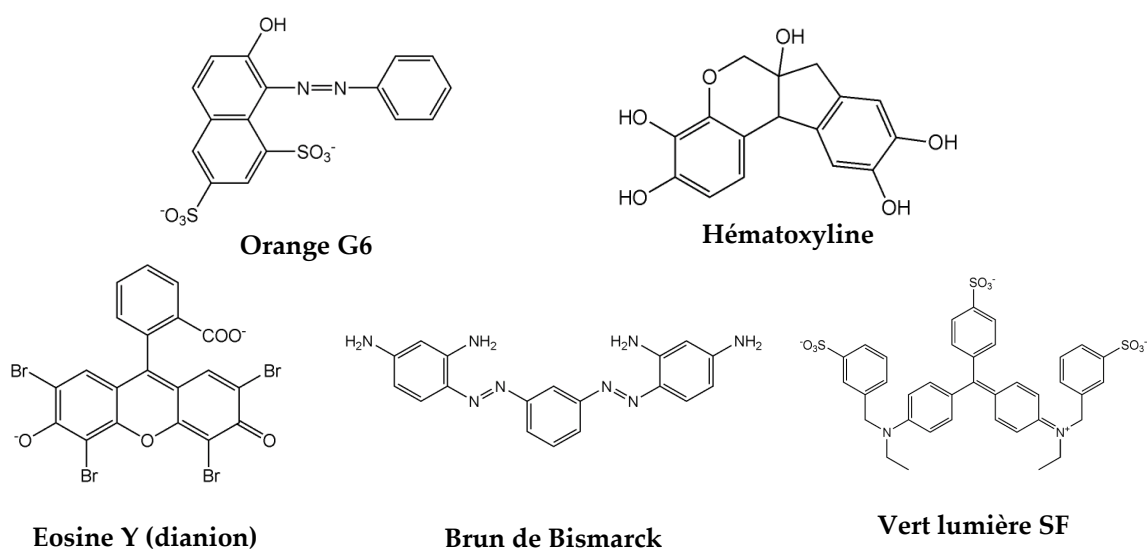


Figure II.2-7 : Structure chimique des différents colorants constituant la coloration Papanicolaou : Orange G6, hématoxyline et les trois colorants composant l'EA50 : éosine Y, brun de Bismarck et vert lumière SF

L'analyse des lames de cytologies : problématique de l'étude

La cytologie a une sensibilité de 70%, elle est spécifique pour les cas normaux mais la littérature répertorie entre 15 et 40% de faux négatifs [35-37]; or les "anomalies" révélées lors de ces frottis dégénéraient en cancer 1 fois sur 4.

Les problèmes majeurs rencontrés lors de l'examen des cytologies sont les cas ASC-US et ASC-H, c'est à dire les atypies de signification indéterminées se rapprochant respectivement d'une lésion précancéreuse de bas grade ou de haut grade. Dans ces cas, les cellules peuvent présenter des dysplasies mais les changements morphologiques ne sont pas suffisamment prononcés et le nombre de cellules atypiques insuffisant pour établir clairement le pré-diagnostic. La patiente est alors suivie régulièrement par FCU.

L'objectif de ce travail est donc de mettre en place une méthode originale, susceptible d'améliorer la sensibilité de la FCU, notamment dans les cas des lames classées ASC-US et ASC-H, en utilisant les propriétés de fluorescence des lames de cytologie, sans modifier le protocole de préparation de ces échantillons.

Dans ce but, une caractérisation systématique des propriétés de fluorescence des différents types cellulaires présents a été effectuée sur les lames de cytologies.

II.3. La microscopie de fluorescence pour améliorer la sensibilité du diagnostic

Comme nous venons de le voir, les échantillons utilisés pour le diagnostic cytologique sont colorés avant d'être analysés. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons caractérisé les propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence des colorants du Papanicolaou avant de commencer l'étude par microscopie de fluorescence des lames de cytologie.

II.3.1. Propriétés photophysiques des colorants du Papanicolaou et des fluorophores cellulaires endogènes

Les colorants du Papanicolaou :

Nous avons précédemment vu que la coloration selon le protocole de Papanicolaou est composée d'OG6, d'hématoxyline et d'EA50.

L'hématoxyline, dans l'eau, possède une transition électronique centrée à 560 nm avec un épaulement à 431 nm. L'OG6, dans l'eau, présente une bande d'absorption avec un maximum à 480 nm et un épaulement à 390 nm (Figure II.3-1 A).

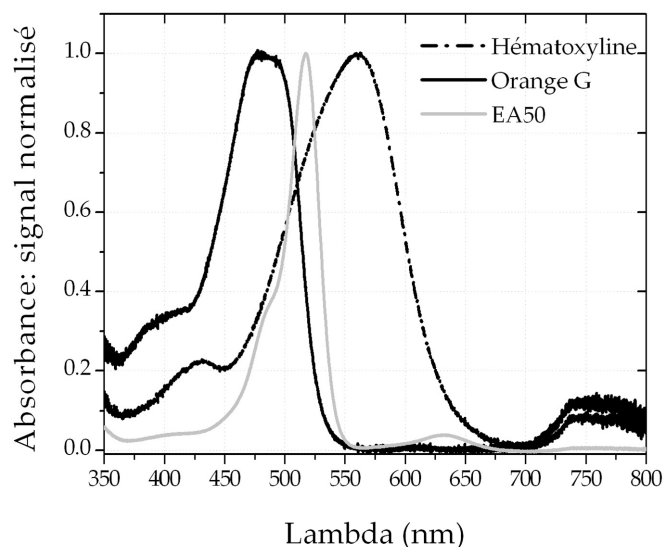


Figure II.3-1 : Spectres d'absorption normalisés de l'hématoxyline, l'OG6 et du EA50 dans l'eau

Comme nous l'avons énoncé plus haut, le EA50 est une solution polychromique (Eosine Y, vert lumière SF et brun de Bismarck). Le spectre d'absorption du EA50 sera a priori la somme des contributions des trois colorants qui le constituent. Peu de données sont répertoriées dans la littérature concernant les propriétés d'absorption du brun de Bismarck et du vert lumière SF : le vert lumière possède un maximum d'absorption centré à 630 nm (Merck index) et le brun de Bismarck un maximum d'absorption centré à 460 nm (Merck index). Par contre, l'éosine Y (produit issu de la réaction du bromide sur la fluorescéine) est très bien connue et présente dans l'éthanol, entre 350 nm et 750 nm, une bande d'absorption centrée à 524 nm ($\epsilon_{(524\text{ nm})} = 11200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Figure II.3-2 C) avec un épaulement à 490 nm [38, 39].

Dans l'eau, le EA50 présente deux bandes d'absorption l'une centrée à 518 nm avec un épaulement autour de 485 nm et l'autre centrée à 633 nm, 25 fois moins intense que la première (Figure II.3-1). Lorsque le EA50 est solubilisé dans l'éthanol, la bande d'absorption comprise entre 400 et 550 nm est décalée vers le rouge (524 nm au lieu de 518 nm ; cet effet de solvatochromisme bathochrome est dû à la stabilisation par le solvant de l'état excité de la molécule. La bande centrée autour de 630 nm se décale quand à elle vers le bleu (effet hypsochrome, 628 nm au lieu de 633 nm) et s'accompagne d'une forte diminution du coefficient d'extinction molaire (Figure II.3-2 B.).

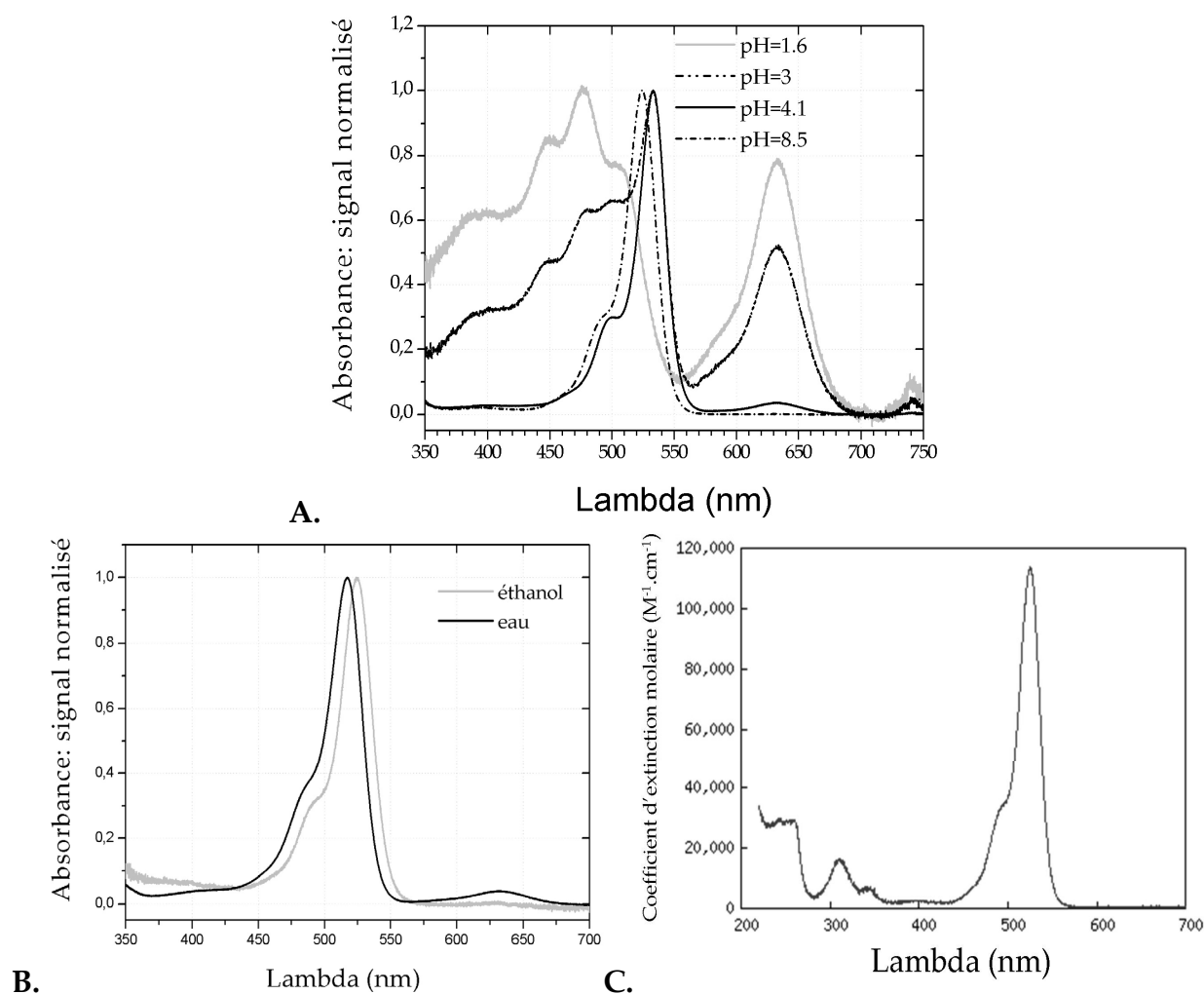


Figure II.3-2 : A. Spectres d'absorption normalisés du EA50 à pH= 1.6, 3, 4.1, 8.5 ; B. Spectre d'absorption normalisé du EA50 dans l'eau, comparé à celui obtenu dans l'éthanol ; C. Coefficient d'extinction molaire $\epsilon(\lambda)$ de l'éosine Y dans l'éthanol [39]

En comparant les spectres d'absorption du EA50 et de l'éosine Y entre 350 nm et 700 nm, on constate que leurs spectres d'absorption dans l'éthanol sont similaires.

D'après l'allure du spectre d'absorption du EA50, dans l'éthanol et dans l'eau à pH = 6-7, les autres colorants (brun de Bismarck, vert lumière) ne contribuent pas au spectre d'absorption du EA50.

La suite de notre étude s'est effectuée sur des cellules colorées selon le protocole de Papanicolaou. Or, il est connu qu'il existe au sein des cellules des variations de pH : le pH peut ainsi descendre jusqu'à 4.5 dans les lysosomes [40].

Comme l'éosine Y est un dérivé de la fluorescéine, les deux molécules présentent des propriétés spectroscopiques similaires. Notamment, la fluorescéine et ses dérivés sont connus pour être très sensibles aux variations de pH [41]. Rappelons que la fluorescéine existe sous cinq formes en milieu aqueux [41, 42] : on peut citer les formes cationique, neutre, monanionique et dianionique (et la forme lactone, dont on ne parlera pas ici). Les pKa de chacune de ces formes ont été déterminés : pKa = 2.2 pour lequel la forme acide monocationique se dissocie en la forme neutre, pKa = 4.4 pour lequel la forme neutre se dissocie en la forme monocationique et pKa = 6.7 pour lequel la forme monoanionique se dissocie en la forme dianionique.

Nous avons donc étudié au préalable l'évolution du spectre d'absorption du EA50 en fonction du pH. Une forte évolution spectrale est observée entre pH = 1 et pH = 3 et entre pH = 3 et 4 (Figure II.3-2 A).

Pour un $1.6 < \text{pH} < 3$, le spectre d'absorption possède deux transitions électroniques centrées à 477 nm et à 633 nm (courbe en gris clair sur la Figure II.3-2 A). La transition centrée à 477 nm possède une structure dont les maxima sont centrés à 400, 450 et 505 nm. La bande d'absorption à 633 nm a un épaulement vers 590 nm. A pH = 3, les transitions subissent de fortes modifications traduisant un changement de forme moléculaire (probablement du à la transition de la forme cationique à la forme neutre de l'éosine Y). Dans ce cas, le spectre conserve les maxima centrés à 400, 450, 477 et 505 nm, mais ils sont plus atténués que pour des valeurs de pH < 3. Un nouveau maximum apparaît centré à 532 nm et on observe une diminution du coefficient d'extinction molaire de la bande centrée à 633 nm.

A pH = 4, l'allure du spectre est complètement modifiée et on a, à nouveau, un changement de forme moléculaire (pKa autour de 4). La transition centrée à 532 nm est conservée, néanmoins, il ne subsiste plus qu'un épaulement centré à 500 nm et les autres structures ne sont plus visibles. La transition électronique centrée à 633 nm est atténuée d'un facteur 20.

Par conséquent, les résultats obtenus pour $3 < \text{pH} \leq 4$, s'accordent avec les valeurs de pKa indiquées pour la fluorescéine (pKa = 4.4) et correspondent au passage de la forme neutre à la forme monoanionique de l'éosine.

A pH 8.5, le spectre subit encore des modifications : la bande centrée à 532 nm se décale vers le bleu et la transition centrée à 633 nm n'est plus visible. On observe un nouveau changement de protonation de la molécule probablement du au passage de la forme monoanionique vers la forme dianionique de l'éosine (pKa ~ 7).

De plus, lors de l'enregistrement des spectres d'absorption en fonction de pH, on a constaté que pour une même dilution, il y avait un ordre de grandeur entre l'absorbance des solutions de pH supérieur à 4 et l'absorbance des solutions de pH inférieur à 4 : les solutions d'EA50 dont le pH est inférieur à 4 possèdent un faible coefficient d'extinction molaire.

Connaissant les valeurs de pH pour lesquelles le EA50 subit un changement de forme moléculaire (pKa autour de 4.4 et 7) et le pH minimal en milieu cellulaire (soit au plus bas 4.5), lors de l'étude des lames de cytologies, on sera probablement en présence de deux formes moléculaires pour le EA50 (contenant notamment les formes mono et di-anionique de l'éosine Y).

Dans le domaine de longueur d'onde accessible par notre microscope confocal (Annexe B2), tous les colorants du Papanicolaou sont excités puisque l'hématoxyline, l'OG6 et le EA50 absorbent entre 350 et 700 nm. Néanmoins, en analysant la fluorescence des colorants, il s'est avéré qu'en régime stationnaire, on ne détectait pas de signal de fluorescence pour l'hématoxyline et l'OG6. Ce qui n'est pas le cas du EA50 qui, suite à une excitation à la longueur d'onde 488 nm, présente une émission de fluorescence (le spectre est représenté sur la Figure II.3-3 A). Ses spectres d'émission enregistrés dans l'eau et dans l'éthanol ont la même allure et sont centrés respectivement à 537 nm et 541 nm (Figure II.3-3 A).

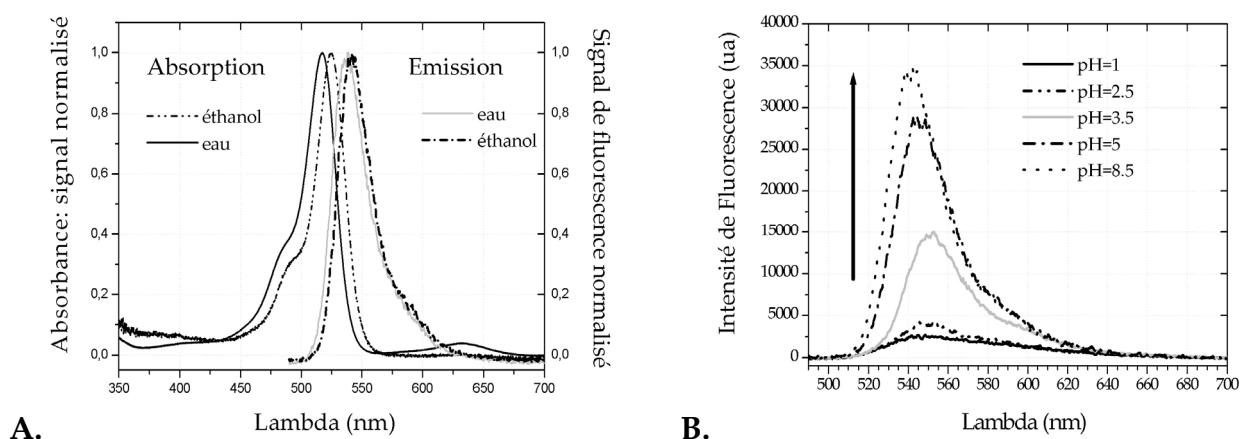


Figure II.3-3 : A. Spectre d'absorption et d'émission de fluorescence de l'EA50 dans l'eau et l'éthanol ($\lambda_{exc} = 480$ nm) ; B. Spectre d'émission de fluorescence de l'EA50 pour différentes valeurs de pH=1, 2.5, 3.5, 5, 8.5 à la longueur d'excitation de 480 nm, pour la même absorbance.

Par conséquent, seul le signal de fluorescence de l'EA50 est détecté en régime stationnaire, ce qui au final se résume à celui de l'éosine Y (spectre présenté sur la Figure II.3-4, son maximum d'émission est centré à 543 nm avec un rendement quantique de 0.67).

De plus, en excitant la solution d'EA50 dans l'éthanol aux longueurs d'onde 488 nm ou 517 nm, les spectres d'émission de fluorescence mesurés sont identiques. On peut en déduire que l'on a qu'une seule espèce chimique, l'éosine Y, qui contribue au signal fluorescence.

Les spectres d'émission ont également été mesurés à différentes valeurs de pH. D'après la Figure II.3-3 B, Les formes anioniques ($pH > 4$) de l'éosine Y ont un signal de fluorescence plus intense que les formes existant à $pH < 4$. Néanmoins, en milieu cellulaire le pH restera compris entre 5 et 7 au maximum et dans cette gamme de pH les spectres d'émission de fluorescence subissent très peu de variation (Figure II.3-3 B) : en effet, si on compare les spectres d'émission enregistrés pour un $pH = 5$ et un $pH = 8.5$, on constate que l'allure des spectres d'émission est identique et on observe uniquement un décalage de 5 nm vers le bleu du maximum d'émission. De plus, la précision de l'instrumentation qui sera utilisée pour l'étude des lames cytologiques colorées selon le protocole de Papanicolaou, n'est pas sensible aux faibles déplacements spectraux. Par, conséquent, les variations d'émission dues à une variation locale du pH ne pourront pas être détectées.

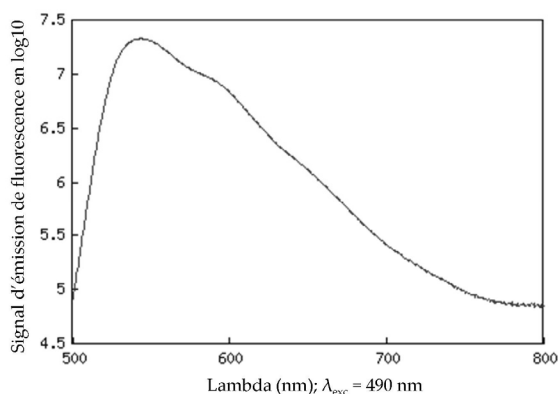


Figure II.3-4 : Spectre d'émission de fluorescence de l'éosine Y, à $\lambda_{exc} = 490$ nm, spectre tiré de [39]

Des mesures de fluorescence résolues en temps sous excitation à deux photons (instrumentation décrite en Annexe B 2, p. 107) ont permis de caractériser la dynamique d'émission de l'OG6 et de l'hématoxyline. L'émission de fluorescence de l'hématoxyline ne peut pas être distinguée de la réponse instrumentale, ce qui justifie qu'on n'observe pas de signal de fluorescence en régime stationnaire.

De même, le déclin de fluorescence de l'OG6 (Figure II.3-5) a une composante majoritaire de courte durée de vie à la limite de la détection de notre instrumentation. Néanmoins, une fluorescence résiduelle a pu être analysée en déconvoluant le déclin de la réponse temporelle de l'instrumentation par un modèle biexponentiel (méthode multiexponentielle). On trouve deux durées de vie de 0.5 ns et 2.9 ns. Ce signal contribue aux données dynamiques de fluorescence dans le cas où les autres fluorophores en présence ont aussi une faible contribution. Ainsi, pour des lames dont la coloration est standard, la contribution du EA50 est beaucoup plus forte que celle de l'OG6 : la composante nanoseconde de l'OG6 est alors masquée par celle du EA50.

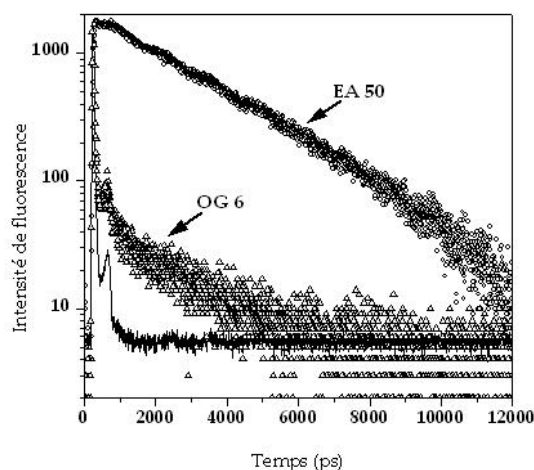


Figure II.3-5 : Déclins de fluorescence normalisés au maximum de l'OG6 (triangle) et du EA50 (rond) dans l'eau et comparés à la réponse temporelle de l'instrumentation (en trait plein) sous excitation à deux photons à 800 nm.

Dans l'eau, le déclin de fluorescence du EA50 (Figure II.3-5) peut être ajusté par un modèle monoexponentiel avec une durée de vie de 2.8 ± 0.2 ns. Comme lors des études de la fluorescence en régime stationnaire, le déclin de fluorescence du EA 50 est dépendant du pH.

Pour un pH = 1, on peut ajuster le déclin par un modèle monoexponentiel de durée de vie de 1.0 ± 0.1 ns, en bon accord avec l'existence d'une seule forme moléculaire à ce pH. Pour pH = 2.5 et 3, le déclin peut être ajusté par un modèle biexponentiel avec $\tau_1 = 0.8 \pm 0.1$ ns et $\tau_2 = 2.4 \pm 0.2$ ns, ce qui est en bon accord avec l'équilibre des formes moléculaires existant à ces pH (voir ci-dessus).

Pour pH > 3, le déclin peut être ajusté par un modèle monoexponentiel avec une durée de vie de 2.8 ± 0.2 ns, confirmant la présence d'une seule espèce fluorescente en solution.

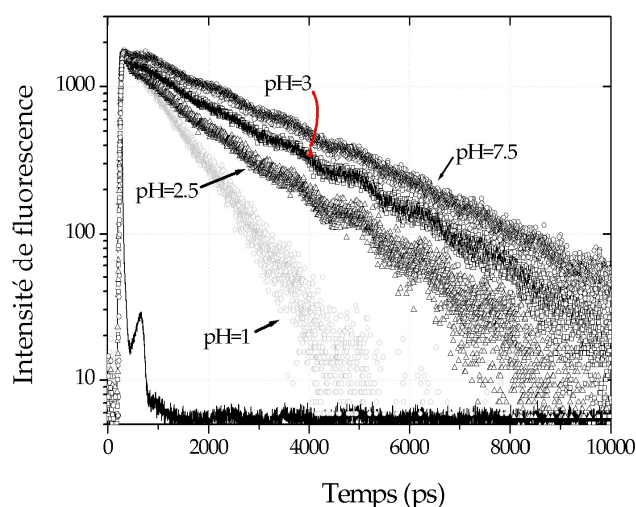


Figure II.3-6 : Déclins de fluorescence normalisés au maximum du EA50 en fonction du pH=1, 2.5, 3, 7.5 comparé à la réponse instrumentale (trait plein)

Pour les expériences en milieu cellulaire, c'est la composante obtenue à pH = 7.5 qui caractérise l'émission de fluorescence du EA50 (du point de vue dynamique). On prendra donc en compte l'espèce moléculaire du EA50 qui a une durée de vie de 2.8 ns.

Les fluorophores cellulaires endogènes :

Les cellules contiennent naturellement des entités fluorescentes comme les dérivés porphyriniques, certains acides aminés, le NADH libre ou lié aux protéines, les flavines ou encore les protéines de structures comme le collagène ou l'élastine.

Cependant, dans le domaine spectral où nos mesures ont été effectuées, les fluorophores endogènes qui pourront participer à la fluorescence sont les différentes forme du NAD(P)H, les flavines et les porphyrines. Les spectres d'émission et d'excitation de ces molécules sont bien répertoriés dans la littérature et sont donnés sur la Figure II.3-7 :

Le **NADPH et le NADH** (coenzyme pyridiniques) sont présents dans tous les types cellulaires, en partie sous forme libre dans les mitochondries et le cytosol. Chacune de ces coenzymes possède une forme oxydée NAD^+ (leur biosynthèse a lieu dans le noyau) et $NADP^+$ [43].

De manière générale, en fonction de l'état de la cellule (réduit ou oxydé, libre ou lié à une protéine), les pyridines nucléotides ont des comportements spectroscopiques différents [44, 45]. Sous forme libre, le NAD(P)H présente deux bandes d'absorption centrées à 265 nm et 350 nm et possède un maximum d'émission de fluorescence à 452 nm. S'il est lié aux protéines, le maximum d'émission est centré à 439 nm. La durée de vie de fluorescence du NAD(P)H libre est de 0.5 ns et celle du NAD(P)H lié aux protéines de 2.5 ns [46-48]. Les formes oxydées ont un coefficient d'extinction molaire très faible et on considère qu'elles ne contribuent que très peu aux spectres d'auto fluorescence [49, 50].

Les **coenzymes flaviniques ou flavines** possèdent plusieurs transitions électroniques centrées à 215 nm, 260 nm, 385 nm et 460 nm. Leur spectre d'émission de fluorescence est centré vers 560 nm (580 nm au sein des tissus [51]). On distingue les flavines mononucléotides (FMN) qui sont membranaires et les flavines adénines nucléotides (FAD) qui sont cytosoliques [52]. Les flavines existant dans différentes conformations (libres, liées...), on observe une distribution de durées de vie comprise entre 3 et 6 ns [48].

Les dérivés **porphyriniques** (qui peuvent jouer le rôle de cofacteur lié de certaines enzymes) présentent classiquement deux bandes d'absorption, la plus intense étant appelée la bande de Soret, (qui correspond à la transition S_0-S_2) centrée à environ 400 nm. Le spectre d'émission de fluorescence des porphyrines présente deux maxima centrés aux alentours de 620 m et à 680 nm. La durée de vie moyenne pour ces espèces sera de 1-10 ns.

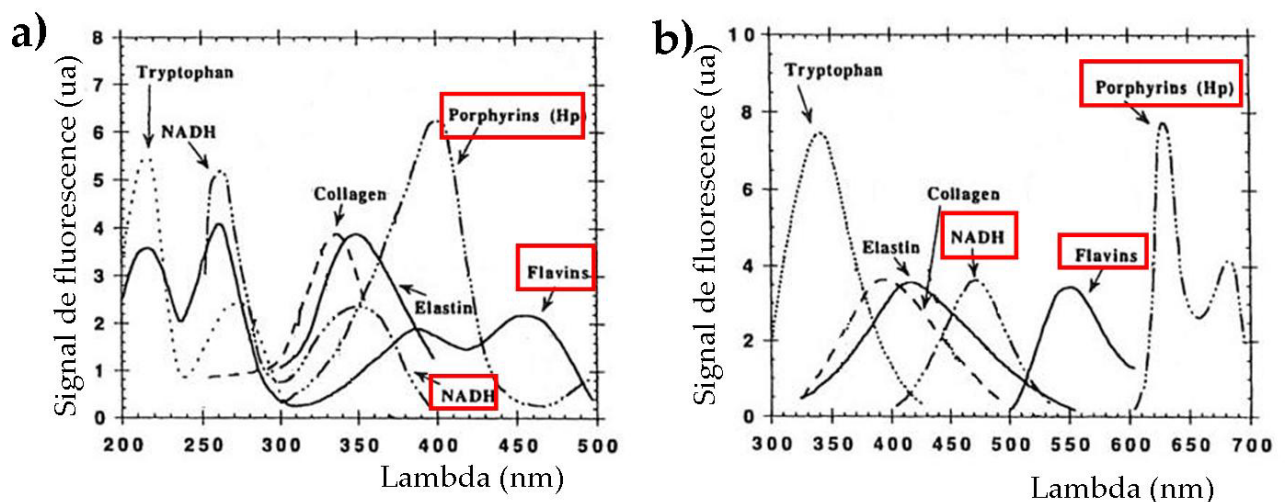


Figure II.3-7 : a) Spectres d'excitation de fluorescence des différents fluorophores endogènes ; b) Spectres d'émission de fluorescence des mêmes composés ; d'après Wagnières G. et al. [53].

Le but de cette étude étant de mettre au point une méthode pour améliorer la sensibilité du diagnostic par microscopie de fluorescence, on doit prendre en compte en plus de l'émission des fluorophores endogènes la fluorescence émise par le EA50 (qui est analysée dans le domaine spectral compris entre 520 nm et 620 nm) et par l'OG6 (qui émet un signal de fluorescence dans le domaine spectral 490 nm à 590 nm).

II.3.2. Identification de la fluorescence des lames cytologiques du col utérin

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.2.4, les lames cytologiques du col utérin présentent plusieurs types différents de cellules. Par conséquent, nous allons simplifier l'étude en ne présentant que les résultats obtenus en microscopie de fluorescence pour les cellules normales et les cellules tumorales des lames diagnostiquées CIN I à III.

II.3.2.1. Cellules normales versus cellules tumorales

Les images d'intensité de fluorescence résolues spectralement ont été acquises avec un microscope confocal commercial (Leica TCS SP2 AOBS, Mannheim, Germany, Annexe B 2) doté d'un objectif x63 (ON 1.4-0.6 à immersion à huile). Les images de fluorescence ont été obtenues en excitant les lames de cytologie avec la raie 488 nm du laser Argon (puissance moyenne d'environ 1-2 μ W mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif) et avec la raie à 633 nm du laser Hélium-Néon (puissance moyenne d'environ 150 μ W). Lors de l'acquisition des spectres d'émission, la fluorescence est imagée sur un photomultiplicateur muni d'une fente de largeur spectrale 10 nm, déplacée avec un pas de 2 nm.

Ce dispositif de microscopie confocale ne nous a pas permis, au cours de cette partie de thèse, d'enregistrer les images FLIM. Celles-ci ont donc été acquises avec le système de microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons, IDEFIX. Les échantillons ont été excités à la longueur d'onde de 800 nm pour bénéficier des avantages du laser Ti :saphir en terme de stabilité, de puissance et de qualité du faisceau laser. La puissance moyenne d'excitation mesurée à l'entrée du statif du microscope est de 1.4 mW.

Propriétés de fluorescence des cytologies cervicales colorées selon le protocole de Papanicolaou

Les images d'intensité de fluorescence de la Figure II.3-8 présentent le signal d'émission caractéristique des cellules normales. La localisation de ce signal de fluorescence est identique que l'échantillon ait été excité sous excitation à un photon (488 nm) ou à deux photons à 800 nm.

Suite à une excitation à 488 nm, les cellules superficielles émettent un fort signal de fluorescence intracellulaire, qui est cependant moins intense dans le noyau que dans le cytoplasme. Comme on peut le voir sur la Figure II.3-8, le signal de fluorescence émis par les cellules intermédiaires est inférieur à celui mesuré pour les cellules superficielles. Les cellules basales ou parabasales se différencient des deux autres types de cellules par un signal de fluorescence intracellulaire faible et un signal intense en périphérie externe de la membrane plasmique.

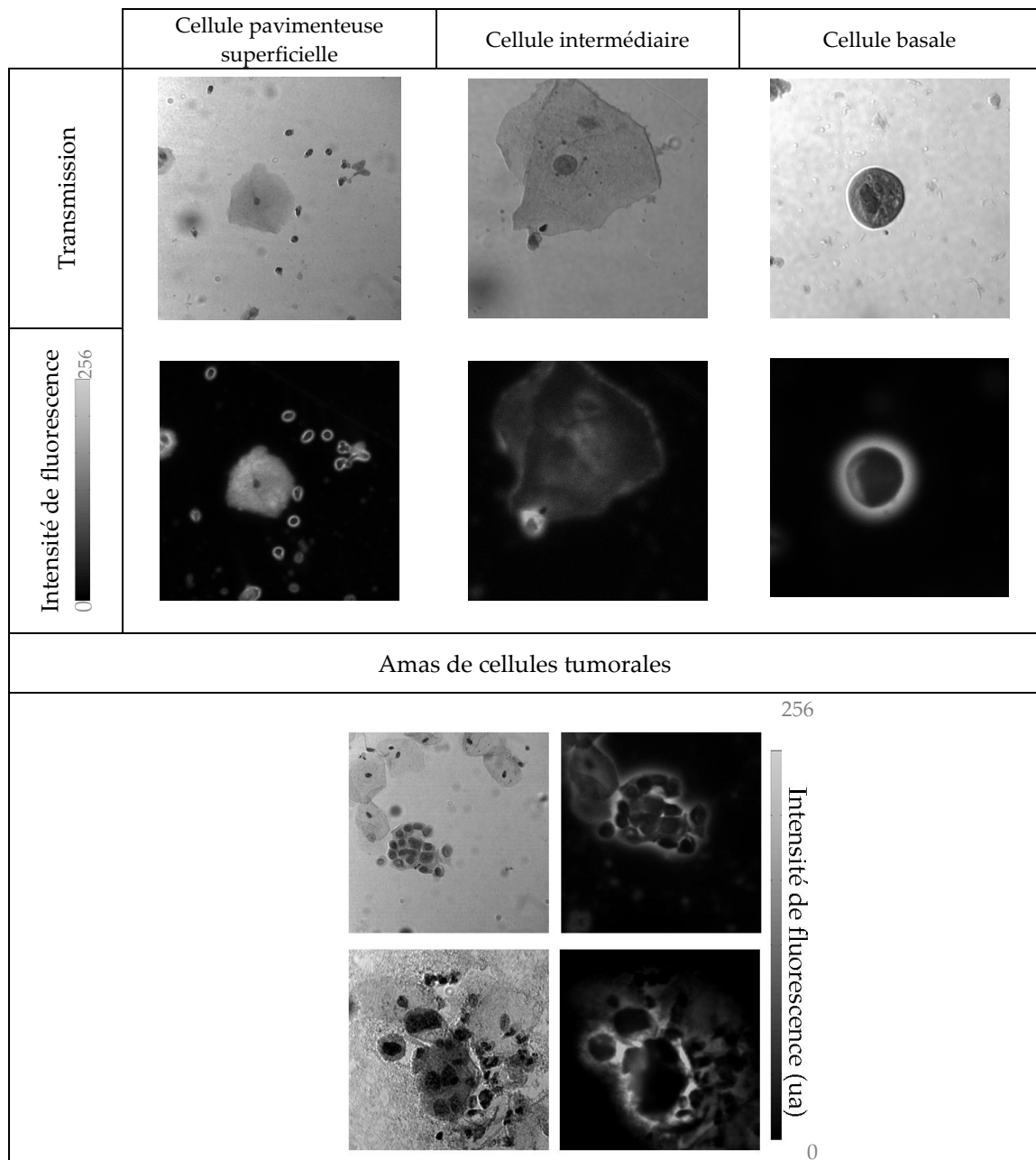


Figure II.3-8 : Images en transmission et images d'intensité de fluorescence des trois types de cellules pavimenteuses (cellules normales provenant de la même lame donc avec les mêmes paramètres d'acquisition) et images en transmission et en intensité d'un amas de cellules tumorales d'une lame diagnostiquée CIN III ; $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = [500 \text{ nm} - 750 \text{ nm}]$

De même, les cellules tumorales repérées sur une lame diagnostiquée CIN III présentent une localisation périmembranaire de la fluorescence, identique à celle des cellules basales (Figure II.3-8).

Cette localisation du signal de fluorescence nous permet de distinguer les cellules tumorales des cellules superficielles et intermédiaires mais pas des cellules basales. Néanmoins, en se basant sur des critères morphologiques (paragraphe II.2.2) très précis, les deux types cellulaires sont aisément différenciables.

Modification de la coloration des lames de cytologie : protocole de Papanicolaou modifié

Pour évaluer l'implication des colorants du Papanicolaou dans le signal de fluorescence, une étude a été menée sur des lames colorées selon un protocole de Papanicolaou modifié, pour lequel l'étape de coloration avec le colorant EA50 a été supprimée. Cette étude a montré que le signal de fluorescence est alors intracellulaire quelles que soient les cellules considérées (Figure II.3-9).

En effet, la fluorescence périmembranaire a disparu, ce qui indique qu'elle est due à une accumulation du colorant EA50 au niveau de la membrane externe des cellules.

Les colorants du Papanicolaou contribuent donc avec les fluorophores endogènes (le NAD(P)H, les flavines et les porphyrines) au signal de fluorescence des cellules des lames de cytologie cervicale.

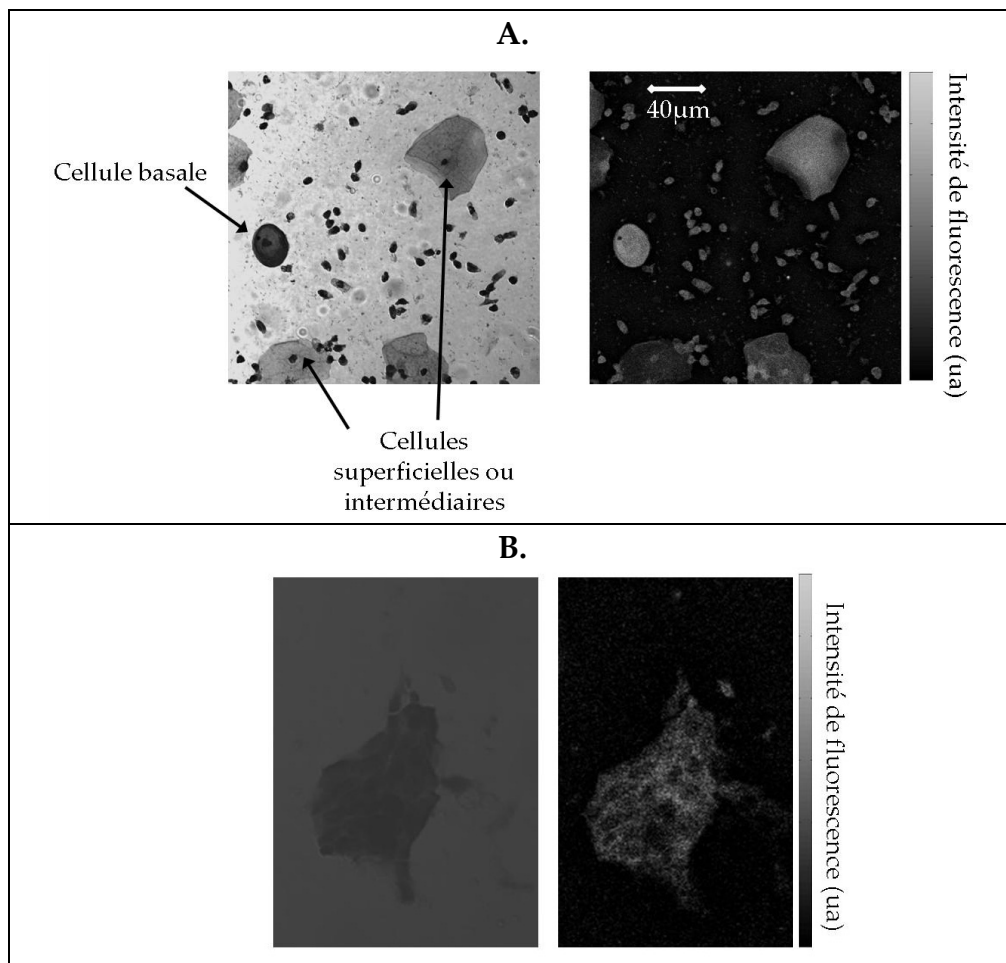


Figure II.3-9 : Images en transmission et d'intensité de fluorescence A. pour les cellules cervicales normales ; B. pour un amas de cellules tumorales colorées selon le protocole de Papanicolaou modifié, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$

Remarquons qu'il aurait également été intéressant d'effectuer des mesures sur des lames sans aucune coloration. Malheureusement, cela n'a pas pu être réalisé lors de ce travail car si on supprime toute coloration des lames de cytologie, il devient alors impossible de distinguer les différents types cellulaires.

Contribution des différents fluorophores au signal d'émission de fluorescence

Nous avons essayé d'analyser plus précisément la contribution de chacun des fluorophores endogènes et des colorants aux images de fluorescence. Une analyse en intensité, spectre et durée de vie a été effectuée sur les domaines spectraux correspondant aux bandes d'émission des fluorophores endogènes NAD(P)H, flavines et porphyrines comme cela a été vu dans le paragraphe II.3.1.

Les images d'intensité et de durée de vie de fluorescence ont été réalisées à 800 nm avec le montage IDEFIX sur les intervalles spectraux d'intérêt. A 800 nm, tous les fluorophores endogènes et les colorants du Papanicolaou sont excités (même si cette longueur d'onde n'est pas optimale pour des fluorophores comme le NAD(P)H [54]). Les domaines spectraux d'analyse ont été sélectionnés à l'aide de filtres interférentiels. Ainsi, le signal de fluorescence du **NAD(P)H** est isolé en utilisant un filtre possédant une bande passante de 40 nm et dont le coefficient de transmission est maximum à **450 nm** ([430 nm – 470 nm]). L'émission de fluorescence des **flavines** est sélectionnée avec un filtre à **550 nm** ([530 – 570 nm]).

Néanmoins, d'après les caractéristiques spectroscopiques des colorants énoncées précédemment, à la longueur d'onde 550 nm, on détectera également la fluorescence du colorant EA50. Et l'OG6 pourra éventuellement contribuer aux signaux de la dynamique de fluorescence. Enfin, la fluorescence des **porphyrines** est isolée de celle des autres fluorophores avec un filtre interférentiel centré à **700 nm** ([680 – 720 nm]). Comme le signal de fluorescence collecté avec les filtres est faible, le temps d'acquisition en chaque point de mesure pour obtenir un déclin de fluorescence est de 10 à 30 s. Ainsi, pour limiter les photodommages qui pourraient être induits lors de ces acquisitions, le nombre de points de mesure est restreint à une vingtaine par image FLIM.

Pour des mesures résolues spectralement, on utilisera le microscope confocal. La raie d'excitation à 488 nm permet d'enregistrer **les spectres d'émission de fluorescence** des flavines et du colorant EA50, sur un intervalle spectral compris entre 500 nm et 700 nm. Sous excitation à 633 nm, on analyse le spectre d'émission des porphyrines sur l'intervalle de détection [650 – 800 nm].

Il faut également noter que les résultats obtenus avec les cellules intermédiaires se sont révélés peu reproductibles. En effet, leur comportement du point de vue des durées de vie de fluorescence est très fluctuant. Néanmoins, elles se rapprochent majoritairement, de celui des cellules basales. Il est fort probable que ces résultats dépendent fortement de l'état de maturation des cellules. En conséquence, seuls les résultats obtenus en régime stationnaire sont présentés pour ces cellules. De plus, lors de nos mesures, nous avons également confirmé que les cellules tumorales provenant des lames diagnostiquées CIN II et III ne se distinguent pas des cellules basales, par leurs propriétés de fluorescence et que les cellules tumorales des lames diagnostiquées CIN I se comportent soit comme des cellules intermédiaires soit comme des cellules basales (ceci semble dépendre du degré de dysplasie observé chez les cellules).

Dans le domaine [430 – 470 nm], sous excitation à deux photons, l'essentiel du signal de fluorescence stationnaire enregistré provient du **NAD(P)H** (Figure II.3-7, filtre interférentiel centré à 450 nm). Au cours des acquisitions, nous avons constaté que le signal de fluorescence du NAD(P)H était environ dix fois moins intense que le signal de la fluorescence totale. Nous avons donc acquis les images avec une puissance moyenne de 10 mW (mesurée avant l'entrée du microscope).

D'après la Figure II.3-10, les images d'intensité de fluorescence obtenues en microscopie biphotonique révèlent que pour chacun des types cellulaires la répartition du signal de fluorescence est uniquement intracellulaire. L'intensité de fluorescence augmente graduellement, des cellules superficielles aux cellules basales. Le signal de fluorescence des cellules superficielles se détache difficilement du bruit de fond alors que le signal de fluorescence des cellules intermédiaires est plus intense dans le noyau que dans le cytoplasme. Les cellules basales ont une fluorescence répartie uniformément dans le cytoplasme et le noyau. Enfin, les cellules tumorales présentent une intensité de fluorescence plus forte dans le cytoplasme que dans le noyau (Figure II.3-11). Les résultats obtenus sur les cellules tumorales concordent avec ceux de l'étude menées sur les cytologies urothéliales [54] et avec une distribution du NAD(P)H dans le cytosol et les mitochondries. Par contre, il semble difficile de justifier la différence d'intensité entre le noyau et le cytoplasme pour les cellules intermédiaires.

La variation du signal de fluorescence du NADH peut être révélatrice d'un changement de l'activité cellulaire, via les propriétés d'oxydoréduction de cette molécule [55-57]. En effet, selon l'activité métabolique de la cellule [58], on peut observer des modifications de la quantité de NADH ou NADPH (fortement fluorescent) par rapport à sa forme oxydée (très peu fluorescente comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent II.3-1). Par conséquent, pour quantifier les variations de fluorescence du NAD(P)H au sein des différentes cellules cervicales (normales et tumorales issues de lames CIN III) colorées selon le protocole de Papanicolaou, l'intensité moyenne de fluorescence dans le domaine spectral [430 – 470 nm] a été calculée sur environ 24 cellules normales (et ce pour chaque type de cellule : superficielle, intermédiaire et basale) et sur environ 24 amas de cellules tumorales issues de lames diagnostiquées CIN III.

Le calcul des rapports de l'intensité de fluorescence moyenne permet de dégager la tendance suivante : le rapport de l'intensité de fluorescence des cellules superficielles sur celle des cellules basales vaut 0.15 ± 0.05 , celui de l'intensité des cellules intermédiaires sur l'intensité des cellules basales vaut 0.4 ± 0.1 et le rapport de l'intensité de fluorescence des cellules tumorales sur l'intensité des cellules basales est égal à 1.1 ± 0.2 . Ainsi aucune différence n'est observée entre les cellules basales et les cellules tumorales du point de vue de l'intensité de fluorescence. Les écarts constatés entre les cellules superficielles ainsi que les cellules intermédiaires et les cellules basales (et tumorales) sont le reflet du degré de maturation et de la nature des cellules étudiées. On a donc un fort changement d'activité cellulaire entre les cellules basales et les cellules superficielles ce qui n'est pas le cas des cellules basales et tumorales.

Les analyses réalisées par imagerie d'intensité de fluorescence ont été complétées par des mesures FLIM.

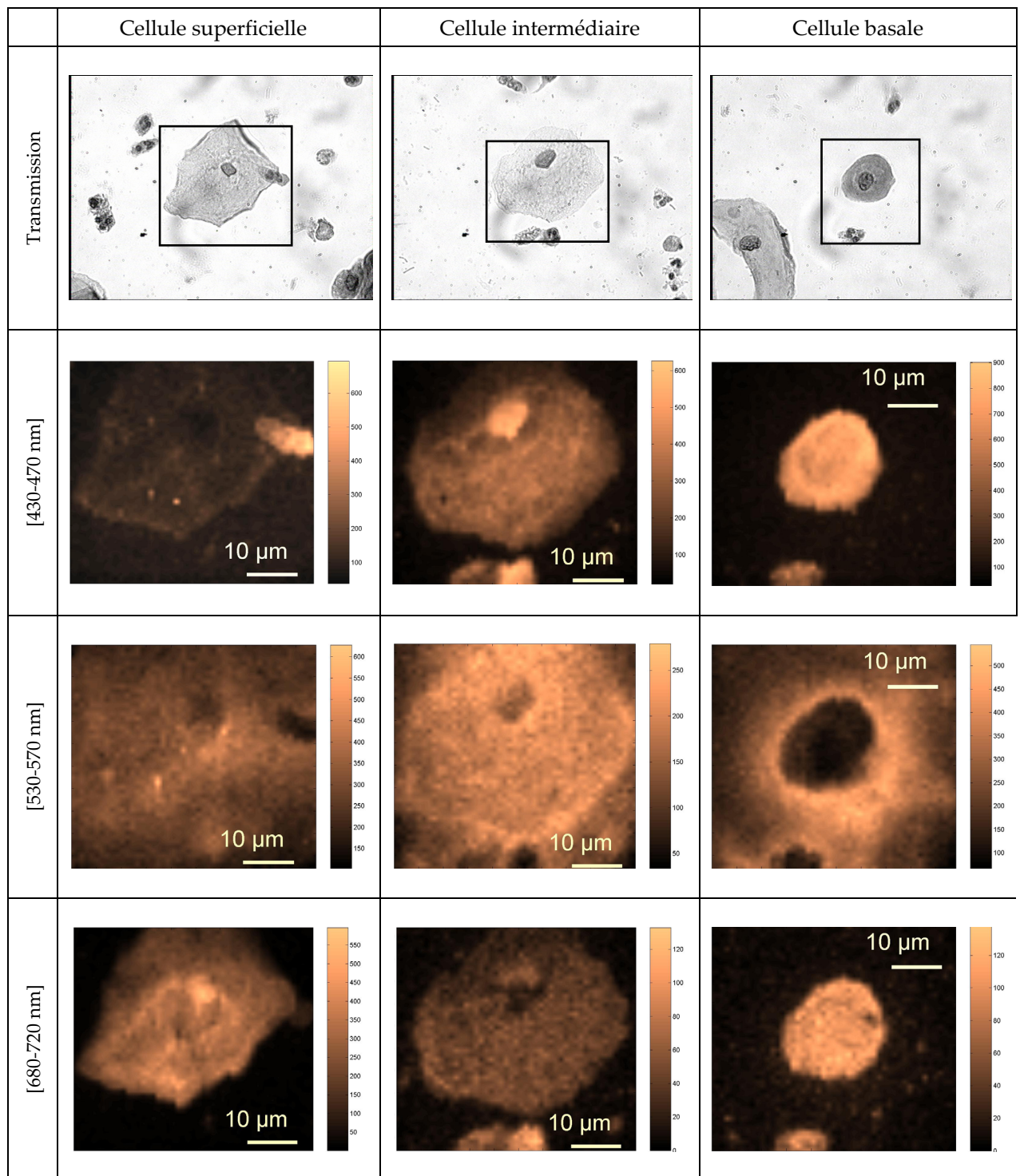


Figure II.3-10 : Images de transmission et d'intensité de fluorescence pour chaque type de cellules normales sur les trois domaines spectraux de l'étude (filtres interférentiels centrés à 450 nm, 550 nm et 700 nm), à $\lambda_{exc} = 800$ nm.

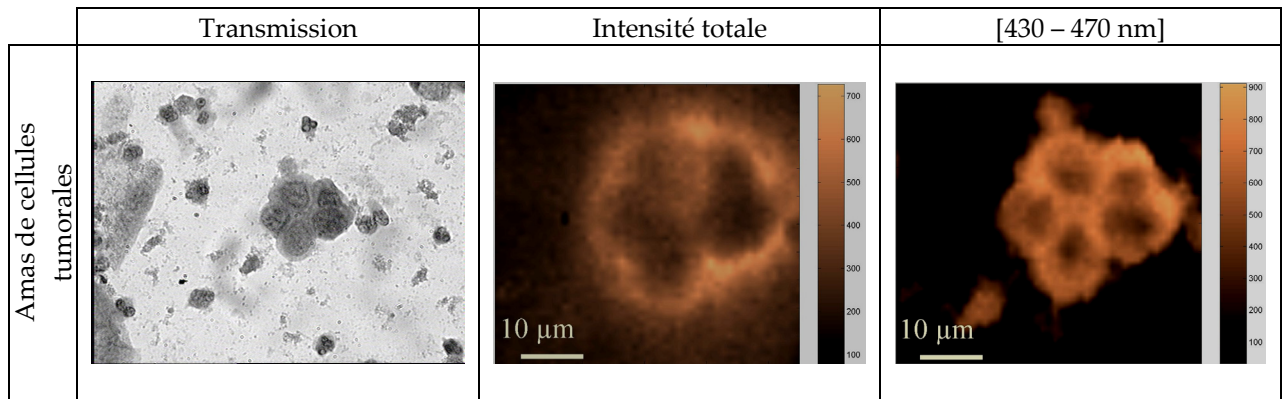


Figure II.3-11 Images de transmission, d'intensité totale de fluorescence et d'intensité de fluorescence sur le domaine spectral [430 – 470 nm], pour un amas de cellules tumorales, à $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$.

Pour chacun des types de cellules, la **durée de vie moyenne** de fluorescence est homogène sur toute la cellule (dans le noyau comme dans le cytoplasme). On peut isoler deux tendances pour les déclin de fluorescence : le déclin de fluorescence caractéristique des cellules superficielles et le déclin de fluorescence commun aux cellules tumorales (CIN II et CIN III) et aux cellules basales (Figure II.3-12 A). Comme nous l'avons dit précédemment, les cellules intermédiaires ont un comportement non reproductible et par conséquent, seuls les déclin de fluorescence des cellules superficielles et basales ont été exploités. Pour chaque type cellulaire, les déclin de fluorescence peuvent être ajustés par un modèle à trois exponentielles.

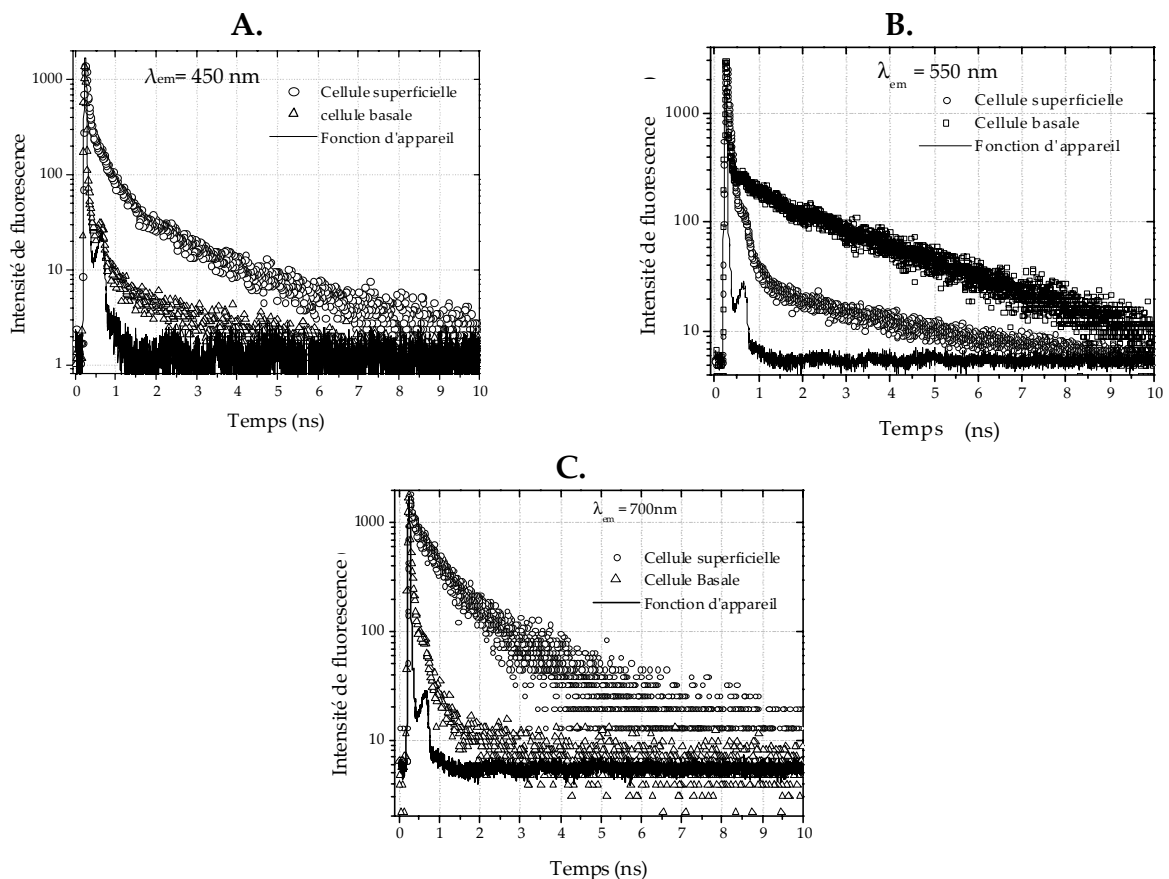


Figure II.3-12 : Déclin de fluorescence normalisés à la valeur au maximum des cellules normales colorées selon le protocole de Papanicolaou classique, A. pour le domaine spectral [430 – 470 nm ; B. pour le domaine spectral [530 – 570 nm] ; C. pour le domaine spectral [680 – 720 nm]

Quel que soit le type de cellule, on trouve une composante de l'ordre de la nanoseconde (environ 2 ns), une composante plus courte de l'ordre d'une centaine de picosecondes et une composante très courte de l'ordre de la dizaine de picosecondes (environ 40 ps) (voir Tableau II.3-1). Les deux premières durées de vie correspondent à celles répertoriées dans la littérature pour les formes libres (environ 0.4 ns) et liées du NAD(P)H en milieu cellulaire (environ 2.5 ns) [59, 60].

La composante de durée de vie ultra-courte a été également mesurée lors d'acquisitions réalisées sur des cellules de lames colorées selon le protocole de Papanicolaou sans EA50. On ne peut donc écarter l'hypothèse que cette composante picoseconde soit due à la présence des colorants OG6 et/ou hématoxyline. Sa forte contribution, surtout pour les cellules basales et tumorales, révèle la faible contribution du NAD(P)H au signal de fluorescence.

On retiendra principalement que l'on peut distinguer par microscopie de fluorescence résolue temporellement les cellules tumorales (de lames diagnostiquées CIN II et CIN III) des cellules superficielles et intermédiaires mais pas des cellules basales.

	A ₁	τ ₁	A ₂	τ ₂	A ₃	τ ₃	<τ>	χ ²	
Cellule superficielle									
450 nm	0.31	2.04	0.35	0.37	0.34	0.04	0.77	3.2	
550 nm	0.82	2.65	0.05	0.19	0.13	0.042	2.2	1.19	
700 nm	0.36	1.9	0.25	0.52	0.39	0.05	0.83	4.1	
Basale (et tumorale)									
450nm	0.18	3.0	0.2	0.32	0.62	0.02	0.61	4.7	
550 nm	intracellulaire	0.86	2.53	-	-	0.14	0.013	2.18	1.15
		extracellulaire	1	2.7	-	-	-	2.7	1.03
700nm		0.1	1.98	0.31	0.11	0.59	0.04	0.20	4.7

Tableau II.3-1 : Résumé des durées de vie de fluorescence pour les différents types cellulaires colorés selon le protocole de Papanicolaou classique par domaine spectral. L'analyse des déclinés a été réalisée méthode multiexponentielle (A_i représente la contribution de chacune des composantes sur l'intensité de fluorescence totale)

Au moment de ces travaux de thèse, nous ne disposions pas de laser UV sur le microscope confocal permettant de réaliser une analyse spectrale de l'émission du NAD(P)H.

Dans le domaine spectral [530 - 570 nm] sous excitation à deux photons, on détecte a priori la fluorescence du EA50 et des dérivés flaviniques. L'émission de fluorescence dans cet intervalle de mesure étant suffisamment intense, les acquisitions sont réalisées à une puissance moyenne incidente de 1.4 mW (mesurée à l'entrée du microscope).

D'après la Figure II.3-10, **les images d'intensité de fluorescence** obtenues en plaçant un filtre interférentiel à 550 nm sont identiques à celles enregistrées sans filtre. Ce résultat a pu être confirmé par des mesures FLIM.

Pour évaluer l'implication des flavines dans le signal d'émission de fluorescence, nous avons entrepris, dans un premier temps, **une étude résolue spectralement**. Les spectres d'émission de fluorescence pour $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ (microscope confocal), ont été enregistrés sur des cellules de lames cytologiques diagnostiquées normales et sur des cellules tumorales de lames diagnostiquées CIN I à CIN III colorées selon le protocole de Papanicolaou. Les propriétés spectrales des cellules tumorales des lames cytologiques diagnostiquées CIN I et CIN II sont identiques à celles des cellules des lames diagnostiquées CIN III.

D'après la Figure II.3-13 A, le spectre d'émission est centré à 550 nm quel que soit le type de cellule et quelle que soit la localisation du signal (intracellulaire ou extracellulaire). Or, cette longueur d'onde correspond au maximum d'émission du EA50. Dans ces conditions, le signal de fluorescence des flavines est probablement masqué par celui du colorant.

Pour vérifier cette hypothèse, des acquisitions ont été réalisées à $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ sur des lames diagnostiquées normales et CIN III **colorées sans EA50**. Elles ont révélées qu'en l'absence de celui-ci les spectres d'émission sont alors centrés autour de 580 nm pour tous les types de cellules (déplacement de la bande d'émission d'environ 20 nm vers le rouge Figure II.3-13 A), ce qui est en bon accord avec les propriétés de fluorescence répertoriées pour les dérivés flaviniques [51].

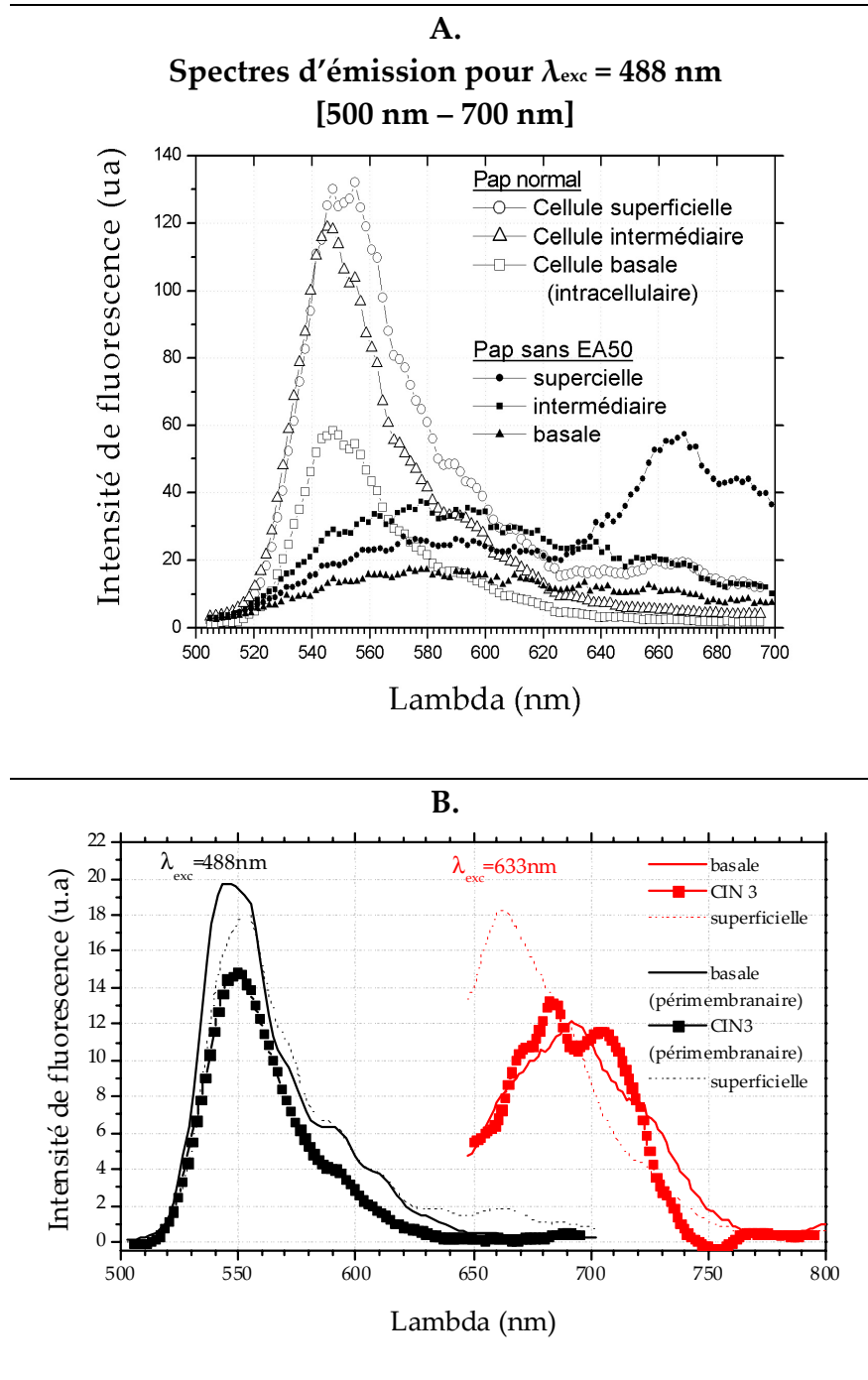


Figure II.3-13 : A. Spectres d'émission de fluorescence des cellules normales (superficielles, intermédiaires et basales) pour $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$. Les spectres obtenus pour une coloration classique au Papanicolaou sont superposés aux spectres obtenus pour une coloration sans EA 50 ; B. Spectres d'émission des cellules tumorales comparés à ceux des cellules normales, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$

Parmi les cellules colorées selon le protocole de Papanicolaou, les cellules superficielles (et intermédiaires) présentent une **répartition homogène des durées de vie** dans leur cytoplasme alors que les cellules tumorales et basales présentent une répartition hétérogène des durées de vie de fluorescence.

L'analyse fine des déclin a montré que le déclin de fluorescence des cellules superficielles comporte trois durées de vie : une composante majoritaire de l'ordre de $2.6 \pm 0.3 \text{ ns}$ qui correspond à la contribution du signal de fluorescence des flavines et du colorant EA50, une composante très minoritaire de l'ordre de $190 \pm 80 \text{ ps}$ et enfin une composante ultra-courte d'environ 40 ps .

Cette dernière joue un rôle plus important dans le déclin de fluorescence enregistré pour les cellules superficielles que dans celui des cellules basales (Figure II.3-12 B.). Elle pourrait correspondre à la contribution de l'OG6 qui marque plus les cellules desquamantes et kératinisées comme les cellules superficielles.

Par contre, comme nous l'avons dit, l'image de durée de vie de fluorescence des cellules tumorales ou basales est hétérogène : en effet dans la zone périmembranaire, le déclin est monoexponentiel avec une durée de vie moyenne de 2.7 ± 0.3 ns, qui correspond à l'émission du EA50, alors que dans la partie intracellulaire la durée de vie moyenne est plus courte $\tau = 2.2 \pm 0.2$. Elle correspond à un mélange entre la contribution des flavines et du colorant EA50 en faible concentration dans le cytoplasme. De plus, on peut la décomposer en deux durées de vie de fluorescence, une durée de vie nanoseconde et une picoseconde ce qui signifie que les deux conformations des flavines (libre et liée) coexistent.

En ce concerne les cellules tumorales, leur spectre d'émission de fluorescence sous excitation à 488 nm est centré à 550 nm et est identique à celui des cellules basales (Figure II.3-13 B). Ceci est valable pour une coloration classique ou modifiée des lames de cytologie.

Ces résultats de fluorescence résolus spectralement obtenus sur les trois types de cellules normales et les cellules tumorales révèlent encore une fois que les propriétés de fluorescence des cellules tumorales et des cellules basales sont identiques.

Il est également intéressant de noter qu'on observe sur le spectre d'émission de fluorescence des cellules superficielles, colorées selon le protocole de Papanicolaou modifié, un deuxième maximum d'émission centré à 670 nm (Figure II.3-13 A) qui correspond à la contribution des porphyrines. On ne retrouve pas ce maximum pour les autres types cellulaires sans doute pour des raisons de concentrations de la molécule. En effet, lors de l'enregistrement des images d'intensité de fluorescence pour une excitation à 633 nm, nous avons pu constater que le signal de fluorescence était plus intense pour les cellules superficielles (l'étude est détaillée à la suite de ce paragraphe). Par conséquent en excitant à 488 nm la bande de Soret des porphyrines présentes au sein des cellules cervicales, on voit apparaître sur le spectre de fluorescence des cellules superficielles, la bande d'émission de fluorescence des flavines et des porphyrines.

La fluorescence des dérivés porphyriniques (ou porphyrines) est détectée dans le domaine de longueur d'onde > 650 nm. D'après la Figure II.3-10, on constate sur les images d'intensité de fluorescence obtenues en plaçant un filtre interférentiel à 700 nm sous excitation à deux photons, que le signal de fluorescence des porphyrines est environ cinq fois plus élevé dans les cellules superficielles que dans les cellules intermédiaires ou basales, ce qui sera confirmé par imagerie spectrale. Néanmoins, l'intensité du signal est trop faible pour pouvoir quantifier ces différences. On peut uniquement en déduire que la concentration des porphyrines dans les cellules superficielles est supérieure à celle des autres cellules.

Des acquisitions faites en excitant les échantillons à $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, nous ont permis d'obtenir les **spectres d'émission des porphyrines** de cellules colorées selon le protocole de Papanicolaou classique. Les résultats sont résumés sur la Figure II.3-14 A, pour les cellules normales et sur la Figure II.3-14 B, pour les cellules tumorales. Trois tendances se dégagent : les cellules superficielles colorées au Papanicolaou ont un spectre d'émission des porphyrines centré à 664 nm, tandis que les cellules tumorales (issues de lames CIN II et CIN III) ont des spectres similaires à ceux des cellules basales centrés à 690 nm. Les cellules intermédiaires ainsi que les cellules tumorales de lames diagnostiquées CIN I ont un comportement intermédiaire et présentent un spectre d'émission centré à 680 nm. Certains des spectres peuvent exhiber une allure structurée qui, en réalité, n'est pas reproductible d'une lame à l'autre.

En comparant les intensités de fluorescence relatives, nous retrouvons le résultat précédemment énoncé selon lequel le signal de fluorescence émis par les cellules superficielles est plus intense que celui des cellules intermédiaires, lui-même plus intense que celui des cellules basales (Figure II.3-13 B). Ces variations d'intensité de fluorescence et de position des maxima d'émission de fluorescence sont probablement dues à la coexistence de différents types de porphyrines dans des conformations différentes à des concentrations variées, dépendant de l'état de maturation de la cellule.

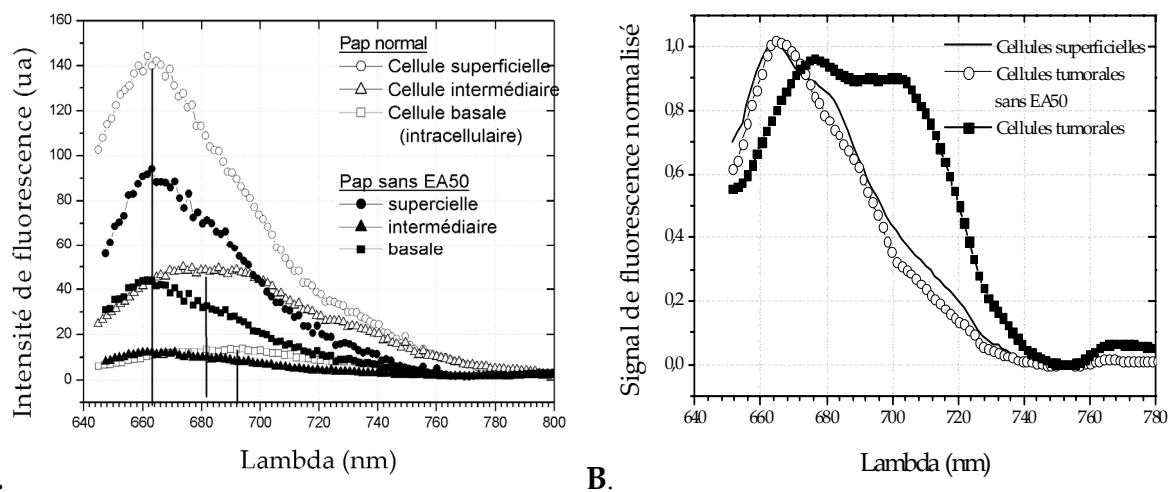


Figure II.3-14 : A. Spectres d'émission de fluorescence des cellules normales comparées entre elles avec une coloration selon le protocole de Papanicolaou, et avec une coloration selon le protocole de Papanicolaou modifié (sans EA50). B. Spectres d'émission de fluorescence des cellules superficielles comparées aux cellules tumorales à $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, colorées selon le protocole de Papanicolaou, avec et sans EA50.

Pour affiner l'étude, les spectres des cellules colorées sans EA50 ont été mesurés. Curieusement, les variations qui caractérisaient chacun des types cellulaires disparaissent avec la suppression de l'étape de coloration au EA50 (Figure II.3-14 A). Dans ce cas, tous les spectres d'émission sont centrés à 664 nm et, comme on peut le voir sur la Figure II.3-14 A et B, ils ont également la même allure que le spectre des cellules superficielles colorées classiquement.

On peut en déduire que les porphyrines interagissent avec l'un des colorants constituant l'EA50. Néanmoins, le(s) colorant(s) avec le(s)quel(s) elles interagissent doivent marquer principalement les cellules autres que les cellules superficielles ; on peut alors supposer qu'il s'agit du brun de Bismarck ou du vert lumière (voir paragraphe II.2.4).

Du point de vue **des durées de vie de fluorescence**, les cellules basales et tumorales ont, encore une fois, un comportement identique. Les données obtenues pour les cellules colorées normales peuvent être ajustées par un modèle avec trois durées de vie de fluorescence (Tableau II.3-1). On a une composante de durée de vie très courte de l'ordre de la dizaine de picosecondes, une composante d'une centaine de picosecondes et une composante de l'ordre de la nanoseconde. La durée de vie nanoseconde contribue plus au déclin de fluorescence dans le cas des cellules superficielles que dans le cas des autres types cellulaires. Comme précédemment, l'existence de la durée de vie d'environ 40 ps traduit la contribution de l'OG6 au signal de fluorescence. Par ailleurs, les cellules normales et tumorales colorées ne peuvent pas être distinguées par leurs propriétés de fluorescence résolues temporellement.

II.3.2.2. Conclusion

Pour résumer, les différences observées statistiquement dans les propriétés d'émission de fluorescence des cellules cervicales concernent les cellules superficielles par rapport aux cellules basales et tumorales du point de vue de l'intensité de fluorescence du NADH et du spectre de fluorescence des porphyrines. Ce n'est néanmoins pas le cas des cellules basales pour lesquelles aucune différence n'a été observée avec les cellules tumorales, que se soit au niveau de l'intensité, du spectre ou de la durée de vie de fluorescence des entités endogènes telles que le NADH, les flavines et les porphyrines. Par conséquent, il semble exclu d'utiliser les fluorophores endogènes comme biomarqueurs pour la détection des états précancéreux des cancers du col utérin sur lame cytologique. De plus, il est fort probable que le signal de fluorescence des fluorophores endogènes soit influencé par l'environnement de la molécule mais également par le mode de préparation des échantillons (cyto centrifugation, fixation, montage).

Le point le plus intéressant de cette étude est l'observation d'un halo de fluorescence au niveau de la membrane externe des cellules tumorales et des cellules basales. Ce halo est dû à l'interaction de l'un ou des colorants composant le EA50 avec la membrane plasmique des cellules, ce qui crée une accumulation périmembranaire. Ce genre de comportement est également observé pour les cellules glandulaires, les cellules métaplasiques et également pour les polynucléaires présents sur les lames cytologiques. Ces résultats suggèrent que la membrane plasmique extérieure des cellules tumorales (entre autre) est modifiée par rapport à celle des cellules normales des couches superficielles de l'épithélium.

D'après la littérature, les cellules présentant une pathologie [61] ou les cellules stimulées par des signaux pro-inflammatoires ou pro-apoptotiques [62-66] ont la bicouche lipidique de leur membrane plasmique qui se restructure. On peut observer une perte de l'asymétrie de la membrane corrélée à la présentation des phosphatidylsérines sur la membrane externe [67-69]. Cette modification entraîne une augmentation des charges négatives sur la couche externe de la membrane plasmique offrant ainsi des sites de liaisons moléculaires comme il a été observé pour l'annexin V (marqueurs fluorescent spécifique des phospholipides de la membrane plasmique) lors de la quantification de l'apoptose [65].

Comme le phénomène d'accumulation du colorant est également observé pour d'autres types de cellules (cellules basales, inflammation ou ayant été stimulée comme les cellules immunitaires polynucléaires), celui-ci peut être généralisé aux cellules en activité mitotique ou néoplasique (prolifération cellulaire). Ces diverses stimulations peuvent être à l'origine d'un remodelage de la membrane plasmique et on peut donc envisager que ces modifications promouvoient des interactions entre la solution polychromatique EA50 et les sites d'externalisation des phosphatidylsérines de la membrane externe des cellules cervicales.

La méthode de lecture des lames de cytologies du col utérin par microscopie de fluorescence a été validée en effectuant des tests en aveugle sur 21 lames de cytologie colorées selon le protocole de Papanicolaou. Seule l'imagerie d'intensité de fluorescence a été utilisée pour ces mesures. Les résultats obtenus ont été comparés avec le diagnostic médical (cytologie et biopsie ou pièce de conisation).

A partir de la localisation de la fluorescence émise, cinq lames ont été classées comme normales et sept lames comme comportant une lésion de haut grade, ce qui est en parfait accord avec le diagnostic par biopsie ou conisation.

Une lame diagnostiquée par cytologie comme CIN II et par biopsie comme CIN III n'a pas été clairement diagnostiquée CIN III par fluorescence.

De plus deux lames classées comme ASCH (dont l'étude est détaillée dans le paragraphe suivant) par cytologie ont été classées comme CIN III par fluorescence et le diagnostic a été confirmé par biopsie. Les lames restantes étaient diagnostiquées soit CIN I soit CIN II. Les cellules de ce type de lames ne se distinguent par franchement les unes des autres. Seul leur examen en transmission permet de faire la différence.

II.4. Validation de la méthode sur les lames atypiques

Atypies caractérisées

Comme nous l'avons énoncé lors de la présentation du matériel cytologique, on peut également trouver sur les lames des cellules infectées par le virus HPV, des cellules glandulaires (endocervicales) qui se démarquent très bien du point de vue morphologique des autres types cellulaires, ainsi que des cellules glandulaires atypiques.

Les cellules infectées par le virus HPV présentent un vide cytoplasmique qui se traduit sur les images d'intensité de fluorescence par un signal de plus faible intensité. Quant aux cellules glandulaires, elles présentent une fluorescence périmembranaire (Figure II.4-1).

A la vue d'une telle diversité cellulaire sur les lames cytologiques, l'émission de fluorescence cellulaire n'est pas suffisante à elle seule et le diagnostic de l'anatomopathologiste reste incontournable.

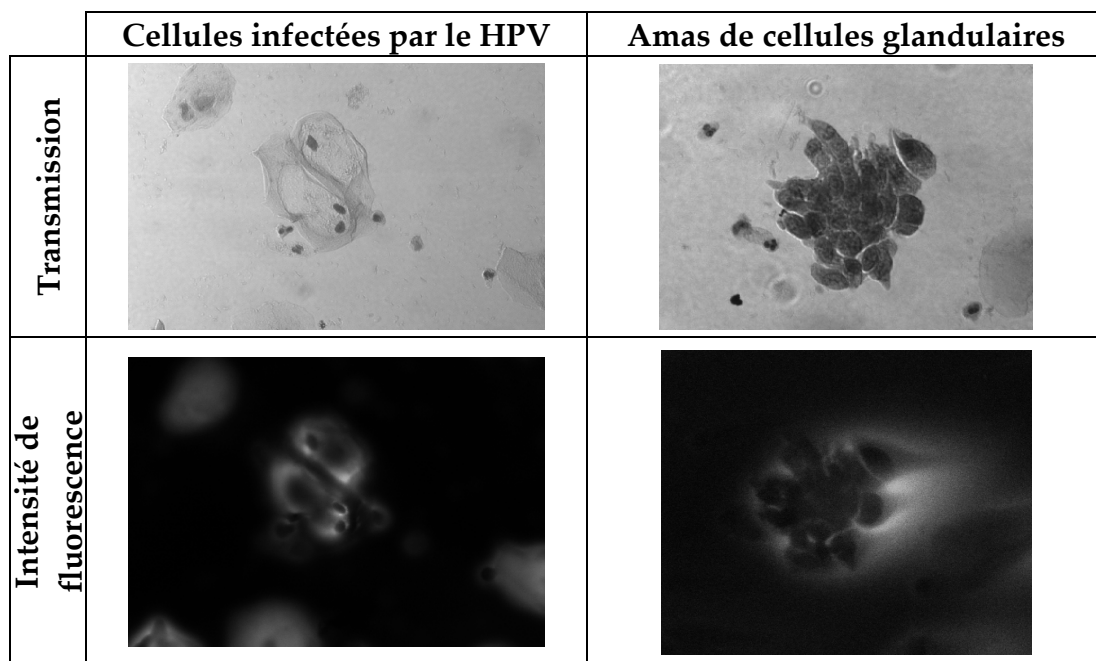


Figure II.4-1 : Images en transmission et en intensité de fluorescence de cellules infectées par le HPV et d'un amas de cellules glandulaires. Les acquisitions ont été réalisées avec le microscope confocal à $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$.

Atypies indéterminées

L'étude des propriétés de fluorescence des lames cytologiques a permis de mettre en évidence une fluorescence périmembranaire pour les cellules en activité mitotique.

Le but de notre étude étant de mettre au point une méthode d'aide au diagnostic des cellules atypiques, nous avons essayé d'utiliser cette propriété intrinsèque des échantillons sur les lames difficiles à diagnostiquer par les anatomopathologistes et classées ASC-US et ASC-H.

Rappelons qu'ASC-US signifie « atypie des cellules malpighiennes de signification indéterminée ». Cela représente de 4 à 6% des frottis. Les modifications cytologiques entrant dans le cadre des ASC-US suggèrent une lésion intraépithéliale malpighienne, mais sont insuffisantes, qualitativement ou quantitativement, pour un diagnostic sûr. Il s'agit de cellules dont le noyau a un diamètre environ 2,5 fois plus grand que son homologue normal.

Il n'y a pas d'autre anomalie nette (pas d'hyperchromatisme net, ni d'irrégularité de la membrane nucléaire). Dans le cas des lames diagnostiquées ASC-US, une évolution vers une lésion de bas grade (CIN I) peut être envisagée : dans 30% des cas, la lésion persiste en bas grade et dans 10% des cas, elle évolue en haut grade. Les images en transmission de la Figure II.4-2 illustrent le type de cellules atypiques que l'on peut rencontrer sur ces lames :

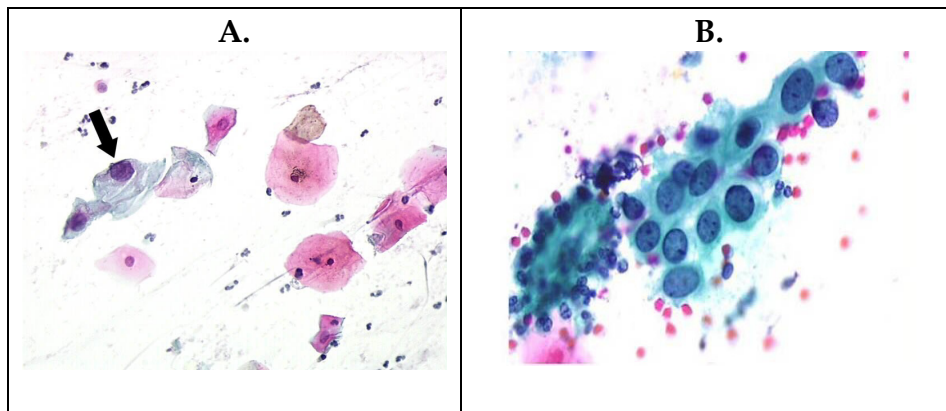


Figure II.4-2 :A. Cellules atypiques d'une lame diagnostiquée ASC-US, B. Cellules atypiques d'une lame diagnostiquée ASC-H (tirées d'un atlas de cytologie, <http://screening.iarc.fr>)

Le cas des ASC-H est plus problématique : ASC-H signifie « atypie des cellules malpighiennes ne permettant pas d'exclure une lésion de haut grade ». Cela représente moins de 10% des ASC. Là encore, on manque de critères pour repérer les atypies cytologiques des cellules malpighiennes qui font suspecter une lésion de haut grade. Ces cas sont associés à un risque plus élevé de lésions intraépithéliales comme CIN II et CIN III.

Nous avons donc entrepris d'étudier par microscopie de fluorescence ce type de lames et plus précisément les cellules atypiques repérées sur ces lames. Nous avons donc réalisé un test pour déterminer si la méthode par microscopie de fluorescence pouvait apporter une aide au diagnostic.

Différents critères permettent de repérer les cellules atypiques. Ils seront un peu différents selon qu'il s'agit de cellules issues des couches superficielles, intermédiaires ou basales. Il s'agit généralement de cellules isolées sur lesquelles on peut observer soit une hypertrophie du noyau avec une zone claire périnucléaire, soit une augmentation du rapport noyau-cytoplasme avec une chromatine peu densifiée, soit une binucléation (exemples donnés en Figure II.4-2). Cette liste non exhaustive rend compte de la difficulté pour les médecins d'établir un diagnostic sur ces lames.

Dans le cadre de ce travail, seulement cinq lames ASC-US et ASC-H ont pu être testées. Les cellules présentes sur ces lames ont pu être classées comme ayant un comportement, soit typique des cellules normales superficielles ou intermédiaires, soit typique des cellules tumorales CIN III (Figure II.4-3). Ce test a été réalisé avec le système MMM pour réaliser une analyse systématique rapide de plusieurs lames.

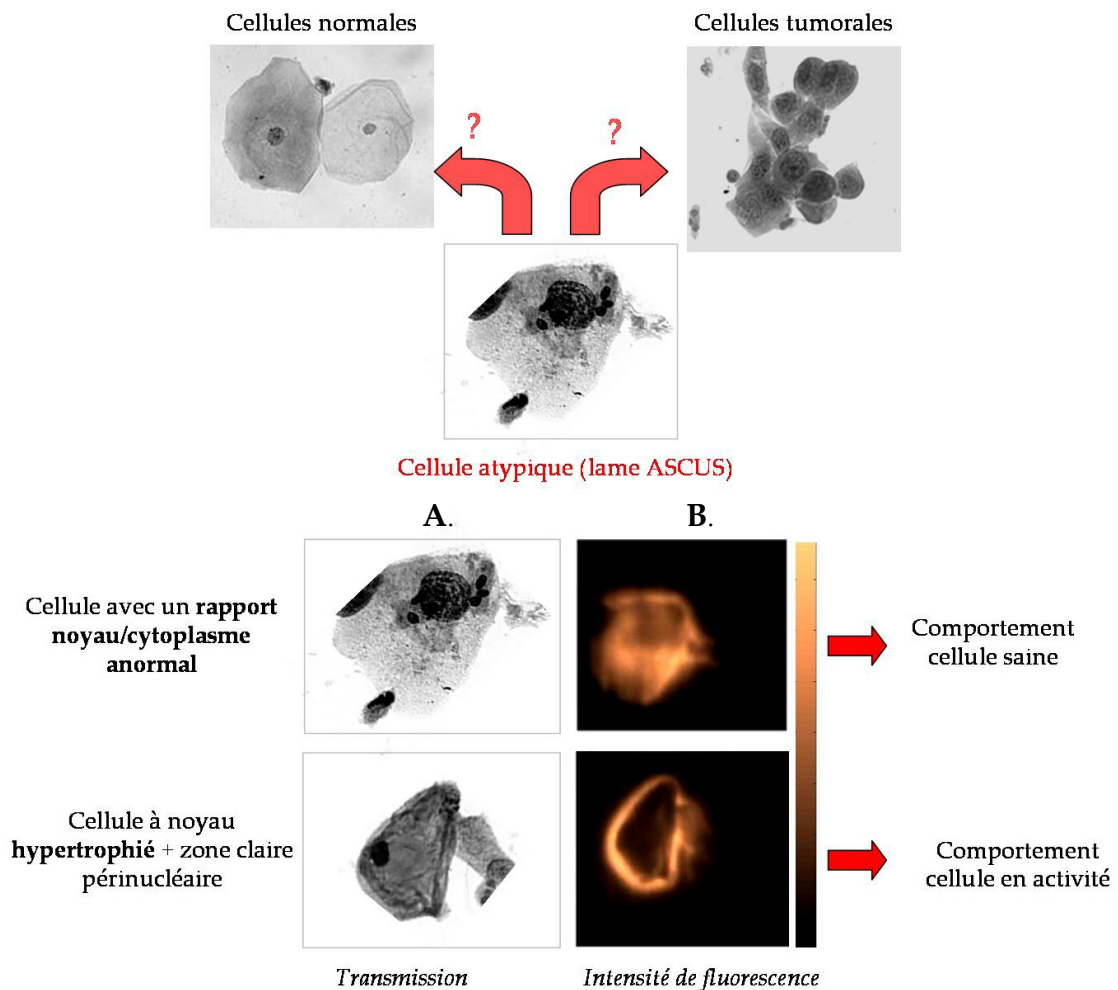


Figure II.4-3 : A. Images en transmission et B. Images d'intensité de fluorescence de cellules isolées atypiques de lames classées ASC-US. Les images de fluorescence ont été acquises avec le système MMM à $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$.

Deux types de cellules atypiques sont présentés sur la Figure II.4-3 . L'analyse de ces deux cellules par microscopie de fluorescence a montré que chacune d'elles avait un comportement différent : l'une présente un signal de fluorescence intracellulaire caractéristique des cellules normales et l'autre le signal périmembranaire des cellules en activité mitotique. Nous sommes donc en mesure de discerner des cellules atypiques et de les classer en deux catégories, en exploitant l'émission de fluorescence des lames de cytologies (Figure II.4-3) : l'analyse de la fluorescence des cytologies colorées selon le protocole de Papanicolaou est donc un bon complément à « l'œil » de l'anatomopathologiste.

Les lames ASC-US ont donc permis de montrer qu'il était possible d'apporter une aide au diagnostic. Sur la base de ces résultats, une étude plus rapide a été entreprise sur les cinq lames ASC-H uniquement avec un microscope en épifluorescence, ce qui prouve la faisabilité en routine de cette méthode.

La méthode d'analyse de la fluorescence des lames de cytologie du col utérin, nous permet de détecter les cellules actives d'un point de vue mitotique et les cellules en prolifération puisque ces cellules présentent un important signal de fluorescence périmembranaire.

En résumé, nous sommes en mesure de distinguer par imagerie de fluorescence les cellules superficielles (cellules desquamantes de l'épithélium) des cellules basales (couche plus profonde de l'épithélium en activité mitotique) et des cellules tumorales. Les cellules intermédiaires présentent un comportement qui se situe entre les deux autres types de cellules normales. Nous avons également montré que les fluorophores endogènes ne pouvaient pas servir de biomarqueurs pour distinguer les cellules normales des cellules tumorales fixées sur lames.

Nous avons pu ainsi prouver que l'acquisition d'images d'intensité de fluorescence des cellules colorées selon le protocole de Papanicolaou permet d'améliorer le diagnostic des lames de cytologie présentant des atypies indéterminées (ASC-US et ASC-H). Les tests cliniques doivent être approfondis pour valider statistiquement la méthode.

L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle est facile à mettre en œuvre pour un médecin puisqu'un simple microscope en épifluorescence est suffisant et qu'aucune modification du protocole de préparation des cytologies cervicales n'est requise : il ne faut que quelques minutes au médecin pour basculer du mode d'illumination en lumière blanche au mode « intensité de fluorescence » pour observer le signal de fluorescence d'une cellule atypique et déceler ou non la présence d'un halo.

Actuellement, la méthode a été validée pour les cancers urothéliaux et est en cours de validation pour les cancers du pancréas (il s'agit toujours de cytologies colorées selon le protocole de Papanicolaou). En supposant que l'hypothèse des sites d'interaction créés par l'externalisation des phosphatidylsérines soit effective, le fait qu'on retrouve une accumulation du EA50 en périphérie de la membrane externe des cellules tumorales, pour différents types de cancer, suggère qu'il existe des sites de liaison ou des molécules membranaires communes, qui fixent le colorant EA50. Néanmoins, les interactions, si elles existent, ne peuvent avoir lieu directement entre les phosphatidylsérine et l'éosine Y du EA50 car ces molécules sont toutes deux globalement chargées négativement.

Annexe B : Matériels et Méthodes

Annexe B 1. Généralités

Caractéristiques principales de l'épithélium

Les cellules épithéliales sont associées en feuillets grâce à des jonctions intercellulaires. Elles reposent sur une membrane basale, revêtent toute la surface du corps et cavités et sont dépourvues de vaisseaux. Elles peuvent protéger, sécréter ou absorber. Il existe 3 trois familles d'épithélium :

- Malpighiens :
 - kératinisant : peau
 - non kératinisant : muqueuses orales et génitales
- Paramalpighiens ou transitionnels :
 - voies urinaires
- Glandulaires :
 - muqueuses digestives

Le col utérin est constitué d'un épithélium malpighien pluristratifié non kératinisant. Il est constitué :

- -d'une couche basale de cellules cubiques, avec des mitoses.
- d'une couche para-basale de cellules polyédriques
- d'une couche intermédiaire de cellules qui tendent à s'aplatir.
- et d'une couche superficielle de cellules aplaties (pavimenteuses).

Ces épithéliums malpighiens non kératinisés se caractérisent ainsi par l'absence de kératinisation, ainsi que par une charge en glycogène des cellules superficielles.

(tiré de «<http://fr.wikipedia.org/>»)

Tumeur

Production pathologique non inflammatoire constituée par un tissu de formation nouvelle.

Classification des tumeurs :

Tissu d'origine	Bénigne	Maligne
Tissu épithélial	—ome	—Carcinome
Malpighien	Papillome, condylome	Carcinome épidermoïde
Transitionnel	Papillome	Carcinome transitionnel
Glandulaire	Adénome	Adénocarcinome

Tableau B-1 : Classification des tumeurs en fonction du tissu d'origine / caractéristiques morphologiques des tumeurs malignes et bénignes

Anomalies cytologiques des cellules tumorales

- Augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique
- Contour nucléaire régulier
- Chromatine mottée
- Gros nucléole
- Mitoses augmentées et anormales

- Taille du noyau variable (anisocaryose)

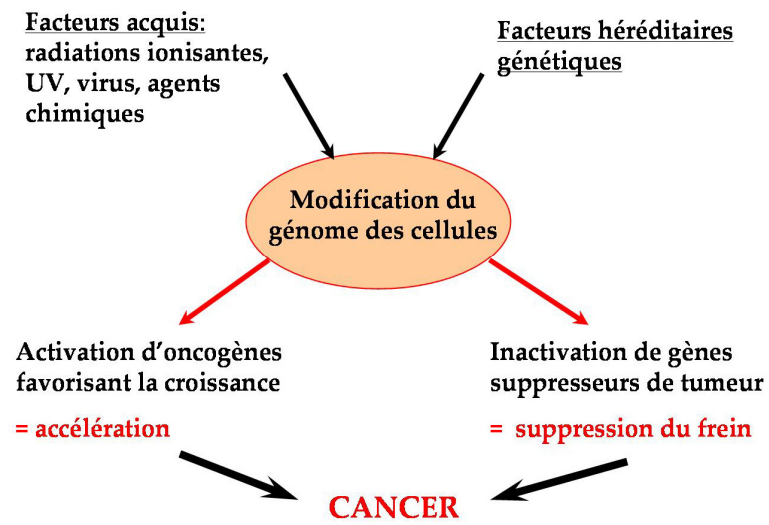


Figure B-1: Causes et effets du cancer

Annexe B 2. Matériels et Méthodes

Préparation des lames de cytologies

Le frottis cervicovaginal est un examen cytologique. Il permet d'analyser des cellules sans tenir compte de l'organisation tissulaire. Lors du frottis, des cellules de l'exocol et de l'endocol sont récupérées.

Le frottis est réalisé à l'aide d'une petite brosse. Le prélèvement est ensuite projeté sur lame, fixé pour préserver l'état morphologique des cellules et enfin coloré selon le protocole de Papanicolaou.

L'examen cytologique permet d'apprécier :

- Les cellules épithéliales (malpighiennes et glandulaires) et on recherche les cellules épithéliales dystrophiques, dysplasiques, infectées par un virus ou tumorales.
- La présence de cellules inflammatoires
- La présence d'agents pathogènes
- La flore bactérienne

Protocole de Papanicolaou

La Figure B-2 récapitule les différentes étapes du protocole de Papanicolaou utilisé pour traitement le matériel cytologique.

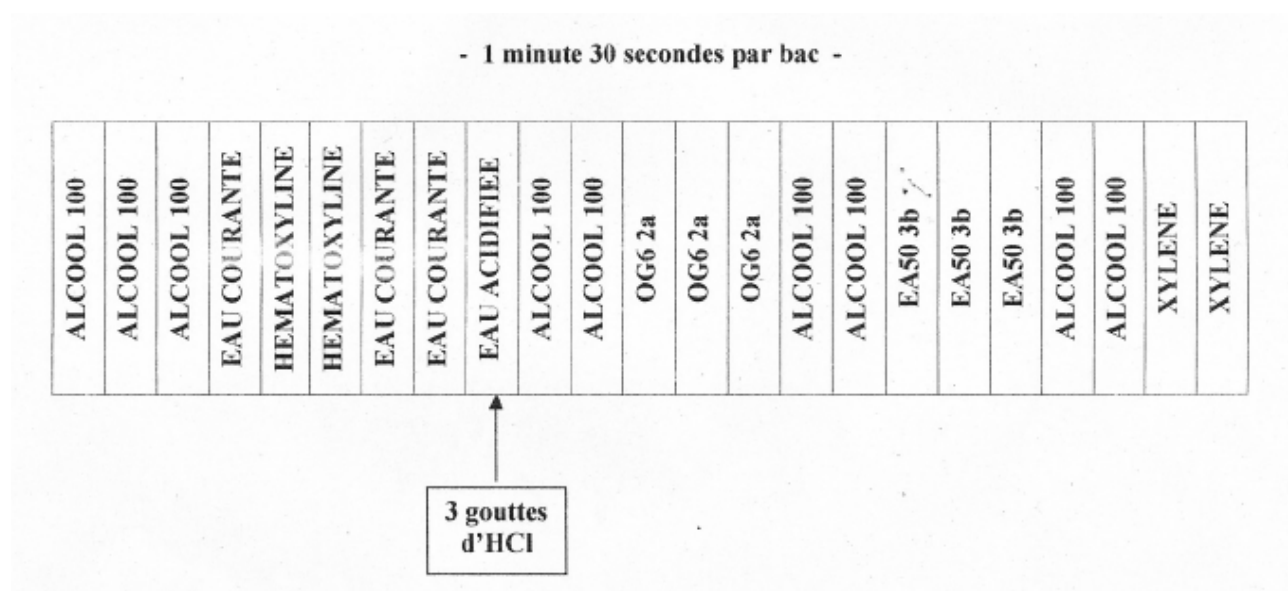


Figure B-2 : Protocole de coloration pentachromique au Papanicolaou.

Pour la coloration modifiée évoquée dans le paragraphe II.3.2.1, les trois étapes de passage dans les cuves contenant du EA50 sont supprimées.

Remarque : les solutions commerciales contenant les colorants sont utilisées pures

Spectrophotomètre et spectrofluorimètre

Les mesures des spectres d'absorption stationnaire ont été réalisées sur un spectrophotomètre double-faisceaux Cary 300 (Varian, Les Ulis, France) avec une bande spectrale large de 1 nm. Le spectre d'émission de fluorescence correspondant est mesuré sur un spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF-3L utilisant une largeur de bande de 3 nm à l'excitation et à l'émission. Des cuves en quartz ont été utilisées avec un trajet optique de 1 cm. Les signaux de diffusion Rayleigh et Raman de l'eau sont soustraits du signal de fluorescence de l'échantillon.

Configuration du microscope confocal lors de notre étude : Le dispositif SP2 Leica

Le système confocal multimodal SP2 permet d'acquérir des images d'intensité résolue spectralement. Le système comporte trois sources lasers visibles internes : un laser Argon (raie à 458, 476, 488, 496, 514 nm) et deux lasers Hélium-Néon (raie à 543, 594 et 633 nm). Le microscope possède un système de trois photomultiplicateurs (PMT) internes.

Les différentes raies délivrées par les lasers (Figure B-3) sont sélectionnées par un système acousto-optique comprenant un cristal transparent placé dans un champ d'ondes ultrasonores. Ce système, plus connu sous le nom de AOTF (Acousto-Optical Tunable Filter), est fondé sur la modification de l'indice de réfraction d'un matériau sous l'effet des ultrasons.

Lorsque la lumière d'excitation passe à travers l'AOTF, elle est diffractée en fonction de sa longueur d'onde et de celle du champ d'ondes ultrasonores. En modulant l'amplitude des ultrasons, il est possible de régler la puissance de chaque raie.

Le microscope possède également un dispositif capable de séparer l'onde excitatrice de l'émission de fluorescence qui permet de s'affranchir des filtres dichroïques classiques: l'AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter) est basé sur le couplage de cristaux acousto-optiques.

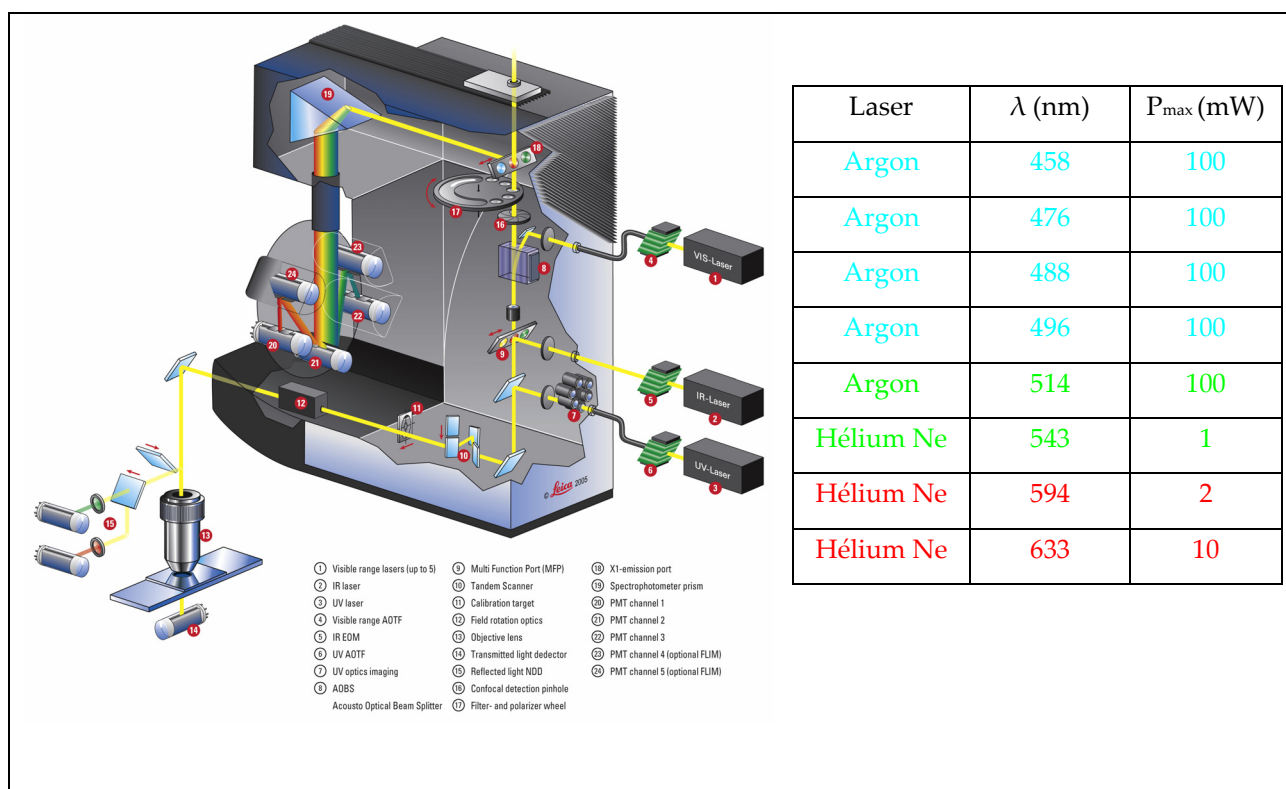


Figure B-3 : Schéma général de fonctionnement du microscope confocal de fluorescence, agencement des optiques, les huit longueurs accessibles avec les trois lasers continus visible, PMT : photomultiplicateur, AOTF: Acousto-Optical Tunable Filter, AOBF: Acousto Optical beam splitter.

Références

1. Steenkeste, K., et al., *Ex vivo fluorescence imaging of normal and malignant urothelial cells to enhance early diagnosis*. Photochem Photobiol, 2007. **83**(5): p. 1157-66.
2. Ferlay, J., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 581-92.
3. Diakomanolis, E., et al., *Vaginal intraepithelial neoplasia: report of 102 cases*. Eur J Gynaecol Oncol, 2002. **23**(5): p. 457-9.
4. Shingleton, H.M., et al., *Human cervical intraepithelial neoplasia: fine structure of dysplasia and carcinoma in situ*. Cancer Res, 1968. **28**(4): p. 695-706.
5. Wilbanks, G.D., et al., *An evaluation of a one-slide cervical cytology method for the detection of cervical intraepithelial neoplasia*. Acta Cytol, 1968. **12**(2): p. 157-8.
6. Richart, R.M., *A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia*. Obstet Gynecol, 1990. **75**(1): p. 131-3.
7. Holowaty, P., et al., *Natural history of dysplasia of the uterine cervix*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(3): p. 252-8.
8. Baillet, P., *Cancérologie*, in *Service de cancérologie*. 2004.
9. Alberts, B., et al., *Cancer*, in *Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion, Editor. 1995, Médecine-sciences: Paris. p. 1262.
10. Bosch, F.X., et al., *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(11): p. 796-802.
11. Ferenczy, A. and E. Franco, *Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia*. Lancet Oncol, 2002. **3**(1): p. 11-6.
12. Franco, E.L., et al., *Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer*. J Infect Dis, 1999. **180**(5): p. 1415-23.
13. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
14. Koutsky, L.A., et al., *A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection*. N Engl J Med, 1992. **327**(18): p. 1272-8.
15. Ostor, A.G., *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review*. Int J Gynecol Pathol, 1993. **12**(2): p. 186-92.
16. Nobbenhuis, M.A., et al., *Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study*. Lancet, 1999. **354**(9172): p. 20-5.
17. Bosch, F.X. and S. de Sanjose, *Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 3-13.
18. Gillison, M.L. and K.V. Shah, *Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 57-65.
19. Wright, T.C., Jr., *Chapter 10: Cervical cancer screening using visualization techniques*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 66-71.
20. Franco, E.L., *Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 89-96.
21. Schneider, D.L., et al., *Cervicography screening for cervical cancer among 8460 women in a high-risk population*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **180**(2 Pt 1): p. 290-8.
22. Stoler, M.H. and M. Schiffman, *Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study*. Jama, 2001. **285**(11): p. 1500-5.
23. Marin, N.M., et al., *Diffuse reflectance patterns in cervical spectroscopy*. Gynecol Oncol, 2005. **99**(3 Suppl 1): p. S116-20.
24. Drezek, R., et al., *Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: modeling, measurements, and implications*. J Biomed Opt, 2001. **6**(4): p. 385-96.

25. Pavlova, I., et al., *Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser-scanning fluorescence confocal microscopy*. Photochem Photobiol, 2003. **77**(5): p. 550-5.
26. Huh, W.K., et al., *Optical detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in vivo: results of a 604-patient study*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(5): p. 1249-57.
27. Nida, D.L., et al., *Fluorescent nanocrystals for use in early cervical cancer detection*. Gynecol Oncol, 2005. **99**(3 Suppl 1): p. S89-94.
28. Hillemanns, P., et al., *Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid*. Int J Cancer, 2000. **85**(5): p. 649-53.
29. Wierrani, F., et al., *5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of intraepithelial neoplasia and human papillomavirus of the uterine cervix--a new experimental approach*. Cancer Detect Prev, 1999. **23**(4): p. 351-5.
30. Kriegmair, M., et al., *Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid*. Urology, 1994. **44**(6): p. 836-41.
31. Steller, W., et al., *Delimitation of squamous cell cervical carcinoma using infrared microspectroscopic imaging*. Anal Bioanal Chem, 2006. **384**(1): p. 145-54.
32. Balas, C., *A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix*. IEEE Trans Biomed Eng, 2001. **48**(1): p. 96-104.
33. Carlson, K., et al., *Confocal microscopy: imaging cervical precancerous lesions*. Gynecol Oncol, 2005. **99**(3 Suppl 1): p. S84-8.
34. Chang, S.K., et al., *Fluorescence spectroscopy as a diagnostic tool for detecting cervical pre-cancer*. Gynecol Oncol, 2005. **99**(3 Suppl 1): p. S61-3.
35. Chidananda, S.M., et al., *Optical diagnosis of cervical cancer by fluorescence spectroscopy technique*. Int J Cancer, 2006. **119**(1): p. 139-45.
36. Fahey, M.T., L. Irwig, and P. Macaskill, *Meta-analysis of Pap test accuracy*. Am J Epidemiol, 1995. **141**(7): p. 680-9.
37. Koss, L.G., *The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy*. Jama, 1989. **261**(5): p. 737-43.
38. Du, H., et al., *PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry*. Photochemistry Photobiology, 1998. **68**: p. 141-142.
39. Seybold, P.G., M. Gouterman, and J. Callis, *Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes*. Photochem Photobiol, 1969. **9**(3): p. 229-42.
40. French, T., et al., *Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy of macrophage-mediated antigen processing*. J Microsc, 1997. **185**(Pt 3): p. 339-53.
41. Valeur, B., *Molecular Fluorescence*. 2002: WILEY-VCH.
42. Lindquist, L., *A flash photolysis study of fluorescein*. 1960: Thesis; Stocklom.
43. Koolman, J. and K.H. Röhm, *Atlas de poche de Biochimie*, ed. Flammarion. 2003: Medecine-Sciences.
44. Schneckenburger, H., et al., *Energy transfer spectroscopy for measuring mitochondrial metabolism in living cells*. Photochem Photobiol, 1997. **66**(1): p. 34-41.
45. Wu, Y., W. Zheng, and J.Y. Qu, *Sensing cell metabolism by time-resolved autofluorescence*. Opt Lett, 2006. **31**(21): p. 3122-4.
46. Lakowicz, J.R., et al., *Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1271-5.
47. Schneckenburger, H., et al., *Time-gated fluorescence microscopy in cellular and molecular biology*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1998. **44**(5): p. 795-805.
48. Schneckenburger, H., et al., *Autofluorescence lifetime imaging of cultivated cells using a UV picosecond laser diode*. J Fluoresc, 2004. **14**(5): p. 649-54.
49. Villette, S., et al., *Ultraviolet-induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantitation of NAD(P)H*. Photochem Photobiol Sci, 2006. **5**(5): p. 483-92.
50. Villette, S., *Analyse Spectroscopique de l'autofluorescence de cellules oesophagiennes saines et tumorales in vitro et developpement d'un microscopetroimageur confocal fibré destiné à l'exploration in vivo*. 2004, Université Paris 6: Paris.

51. Ettori, D., *Spectroscopie d'auto fluorescence induite par laser appliquée à la détection précoce de cancer*. 1996, Université Paris-Nord.
52. Zinsou, C., *Cours de Métabolisme*, Université des antilles et de la Guyane.
53. Wagnieres, G.A., W.M. Star, and B.C. Wilson, *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications*. Photochem Photobiol, 1998. **68**(5): p. 603-32.
54. Huang, S., A.A. Heikal, and W.W. Webb, *Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein*. Biophys J, 2002. **82**(5): p. 2811-25.
55. Anidjar, M., et al., *Argon laser induced autofluorescence may distinguish between normal and tumor human urothelial cells: a microspectrofluorimetric study*. J Urol, 1996. **155**(5): p. 1771-4.
56. Ramanujam, N., et al., *Spectroscopic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in vivo using laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths*. Lasers Surg Med, 1996. **19**(1): p. 63-74.
57. Salmon, J.M., et al., *Microspectrofluorometric approach to the study of free/bound NAD(P)H ratio as metabolic indicator in various cell types*. Photochem Photobiol, 1982. **36**(5): p. 585-93.
58. Kirkpatrick, N.D., et al., *Endogenous fluorescence spectroscopy of cell suspensions for chemopreventive drug monitoring*. Photochem Photobiol, 2005. **81**(1): p. 125-34.
59. Scott, T.G., et al., *Emission properties of NADH. Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH and simplified synthetic models*. J. Am. Chem. Soc., 1970. **92**: p. 687-695.
60. Visser, A.J. and A. Van Hoek, *The fluorescence decay of reduced nicotinamides in aqueous solution after excitation with UV-mode locked Ar ion laser*. Photochem Photobiol 1981. **33**: p. 35-40.
61. Robert, O., *Biological systems: Structures, Dynamics and functions*. , ed. I.R. croisés. 2003, Institut Curie, Paris.
62. Diaz, C. and A.J. Schroit, *Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry*. J Membr Biol, 1996. **151**(1): p. 1-9.
63. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
64. Martinez, M.C., C. Kunzelmann, and J.M. Freyssinet, *[Plasma membrane remodelling and cell stimulation]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(2): p. 189-95.
65. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
66. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1121-32.
67. Devaux, P.F., *Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes*. Biochemistry, 1991. **30**(5): p. 1163-73.
68. Utsugi, T., et al., *Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes*. Cancer Res, 1991. **51**(11): p. 3062-6.
69. Woehlecke, H., et al., *Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2)*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 2): p. 489-95.

PARTIE III. DETECTION PAR IMAGERIE DE FLUORESCENCE DE LA RESISTANCE A UNE POLYCHIMIOThERAPIE DES CANCERS UROTHELIAUX

III.1.	Objectif de l'étude.....	115
III.2.	Modèle d'étude : le carcinome urothélial.....	115
III.2.1.	Anatomie pathologique	115
III.2.2.	Traitements standards des cancers urothéliaux.....	117
III.2.3.	La résistance aux agents chimiothérapeutiques dans les tumeurs urinaires ..	118
III.2.3.1.	<i>Mécanismes généraux de résistance aux agents antitumoraux du MVAC.....</i>	<i>118</i>
III.2.3.2.	<i>Techniques existantes pour la détection de la MDR.....</i>	<i>120</i>
III.3.	Etudes spectroscopiques du MVAC : de la solution au milieu cellulaire	120
III.3.1.	Présentation de la polythérapie MVAC.....	120
III.3.2.	Propriétés spectroscopiques : De la solution.....	122
III.3.3.	...Aux résultats en milieu cellulaire	124
III.3.3.1.	<i>Evaluation des doses d'agents antitumoraux à utiliser</i>	<i>125</i>
III.3.3.2.	<i>Suivi au cours du temps de l'intégration et de la localisation de l'agent antitumoral par microscopie confocale</i>	<i>127</i>
III.3.3.3.	<i>Colocalisation.....</i>	<i>131</i>
III.3.3.4.	<i>Imagerie résolue spectralement et temporellement</i>	<i>136</i>
III.3.3.4.1.	<i>Imagerie spectrale.....</i>	<i>136</i>
III.3.3.4.2.	<i>Imagerie de durée de vie</i>	<i>138</i>
III.3.3.5.	<i>Bilan.....</i>	<i>140</i>
III.3.4.	...Vers un protocole expérimental pour établir un test prédictif de MDR	140
III.4.	Perspectives : Premier test clinique.....	142
	Annexe C : Matériels et Méthodes.....	144
	Références	152

III.1. Objectif de l'étude

Actuellement la chimiothérapie est omniprésente dans le traitement des cancers que ce soit en traitement curatif, en néoadjuvant (avant l'intervention chirurgicale pour réduire la taille de la tumeur), en traitement post-opératoire pour limiter les risques de récurrence ou en traitement combiné avec la radiothérapie. L'existence de phénomènes de résistance au sein de la tumeur est l'obstacle majeur au traitement par chimiothérapie antitumorale. Ces résistances aux agents antitumoraux (multidrug resistance ou MDR) peuvent être observées avec ou sans phase de sensibilisation dès les premières séances de traitement. Idéalement, il faudrait être en mesure de détecter ces processus de résistance aux traitements antitumoraux afin d'éviter d'exposer le patient déjà affaibli par la maladie à un traitement aux lourds effets secondaires qui serait alors inefficace et qui minimiserait ses chances de rémission. De nombreux tests ont ainsi été développés ces dernières années, afin de prédire l'efficacité clinique des médicaments utilisés en oncologie. Mais comme la résistance aux antitumoraux n'est pas monofactorielle (nous le verrons dans la partie III.2.3.1), de nouveaux tests pour détecter les résistances aux traitements sont nécessaires. Ils doivent bénéficier d'évaluations standardisées afin de pouvoir être inclus dans une stratégie thérapeutique générale.

Dans la partie II de ce travail portant sur le col de l'utérus, nous avons vu qu'il était possible, en utilisant la fluorescence comme facteur de contraste, d'améliorer la sensibilité du diagnostic anatomo-pathologique fait sur lames cytologiques des états précancéreux. Une démarche expérimentale similaire a été entreprise afin de mettre au point une méthode qui permettrait de déceler, en amont du traitement d'un patient, une éventuelle résistance aux chimiothérapies combinées les plus utilisées pour les cancers urothéliaux. La mise au point d'un test non contraignant, peu coûteux et permettant d'évaluer rapidement l'efficacité du futur traitement, représente un enjeu majeur de la thérapie anticancéreuse.

III.2. Modèle d'étude : le carcinome urothélial

L'incidence mondiale des cancers urothéliaux augmente d'année en année : en France il se situe au 5^{ème} rang et on estime que 50% des patients ayant une tumeur infiltrante vont décéder des suites de la maladie.

III.2.1. Anatomie pathologique

Du point de vue histologique, 90% des tumeurs de vessie gardent les caractéristiques de la muqueuse normale de la vessie et sont appelées « carcinome urothélial » [1, 2].

On trouve très rarement des tumeurs « non urothéliales » et exceptionnellement des tumeurs de type : mélanome, phéochromocytome, lymphome, choriocarcinome.

La classification des carcinomes urothéliaux inclut la notion de stade et de grade de la lésion. Ces paramètres sont déterminants pour le pronostic et le traitement à adopter. Le grade de la lésion est déterminé par l'importance des anomalies présentées par les cellules de la tumeur, c'est à dire le degré de ressemblance cytologique et architectural entre la tumeur et son tissu d'origine. Ainsi, plus la cellule est « anormale » plus le grade est élevé (bien différenciée ; moyennement différenciée ; peu différenciée, indifférenciée, anaplasique voir détails en Annexe C 1).

De même le stade sera évalué par la profondeur de la tumeur au sein de la paroi vésicale et son extension hors de la vessie (classification TNM ; T : Tumeur primitive, N : Métastases ganglionnaires lymphatiques, M : Métastases à distance, au cours de notre étude seules les tumeurs localisées seront évoquées). En pratique, on distingue les tumeurs superficielles des tumeurs infiltrantes (voir Figure III.2-1).

Il existe d'autres types de tumeurs : le carcinome *in-situ* par exemple qui se distingue des autres par sa morphologie : il s'agit d'une tumeur plate située au dessus de la membrane basale de la muqueuse urothéliale et ayant un fort potentiel invasif si elle n'est pas traitée.

A chacun de ces cancers correspond un protocole thérapeutique standardisé qui pourra ou non combiner chirurgie, radiothérapie et/ou chimiothérapie.

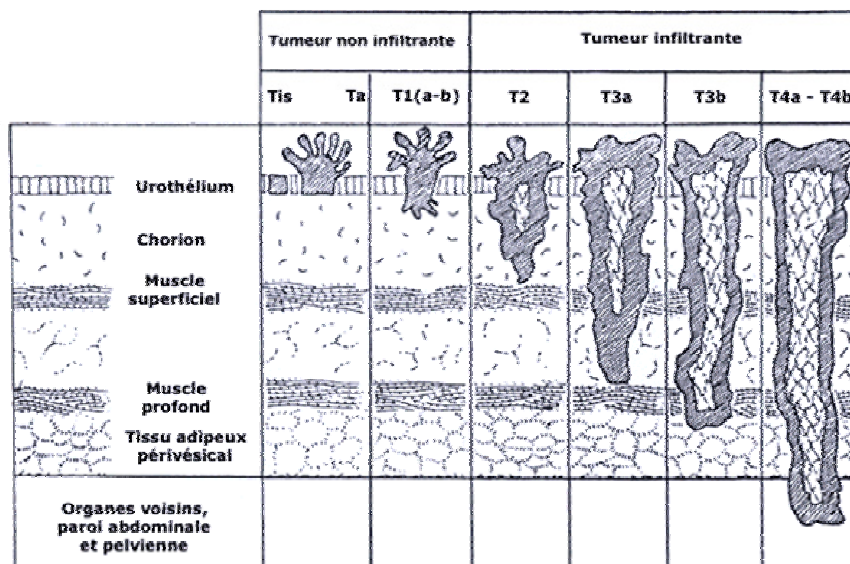


Figure III.2-1 : Schéma simplifié illustrant les différents grades des tumeurs primitives urothéliales selon la classification TNM (détails donnés en Annexe C 1)

Les Facteurs de risque

90% des cancers urothéliaux diagnostiqués peuvent être attribués au tabac. Les autres facteurs sont d'origine industrielle (les amines aromatiques, leurs dérivés hydroxylés halogénés et sulfonés, les dérivés de l'aniline, certains hydrocarbures polycycliques et les dérivés industriels du tryptophane) et certaines infections parasitaires peuvent dégénérer en lésions malignes de type cancer épidermoïde de la vessie.

Détection et diagnostic

Couramment, c'est la présence de sang dans les urines qui va alerter le patient. Le dépistage des carcinomes de vessie associe des moyens radiologiques (échographie vésicale, scanner pelvien), mais aussi des examens urologiques (cystoscopie et fibroscopie vésicale) et anatomo-pathologiques (la cytologie urinaire).

La cytologie est intéressante et utile en cancérologie urologique car elle s'intègre au protocole de diagnostic initial des tumeurs et de surveillance des malades pendant et après le traitement en complément de la cystoscopie et des biopsies.

Si les lésions papillaires sont bien reconnues par la cystoscopie et par l'analyse histologique, les lésions muqueuses planes sont quant à elles difficiles à repérer. Dans ce cas, la cytologie urinaire est particulièrement importante : lorsqu'elle est positive (présence de cellules tumorales indiscutables), elle incite aux biopsies multiples. L'absence de cellule tumorale exclut au contraire presque totalement une lésion de haut grade [3]. Néanmoins, la cytologie évalue mal la présence de lésion de bas grade.

Finalement, le traitement sera choisi en fonction du grade et du stade de la lésion ainsi que de l'état physique du patient.

III.2.2. Traitements standards des cancers urothéliaux

Chirurgie et chimiothérapie

Dans le cas des tumeurs superficielles, un traitement chimiothérapeutique local, comme des instillations intravésicales de BCG ou de mitomycine C peut être administré en complément après ablation. Pour les tumeurs infiltrantes, l'ablation de la vessie est le traitement le plus efficace mais le plus invasif. Si la tumeur s'étend au delà de la vessie, l'ablation n'est plus envisagée et un traitement par chimiothérapie sera entrepris.

Plusieurs études ont montré qu'un traitement systémique¹ associé à la chirurgie améliore la survie, avec une diminution du risque de décès de 13% et un bénéfice de 5% sur la survie en 5 ans. On peut préciser que ce bénéfice est statistiquement significatif si l'on utilise des régimes de polychimiothérapie à base de sels de platine comparé à des monothérapies par cisplatine [4].

Radiothérapie et chimiothérapie

La radiothérapie est rarement utilisée seule ou alors dans un but palliatif en cas d'impossibilité à effectuer une intervention chirurgicale. L'association radio-chimiothérapie (ARC) peut également être envisagée. Elle combine ainsi la radiothérapie à une chimiothérapie (à base de cisplatine et de 5-FU fluorouracil) et semble supérieure, en terme d'efficacité, à la radiothérapie seule.

Chimiothérapie et immunothérapie

Enfin, les traitements chimio et immunothérapeutiques peuvent classés en deux sous-groupes :

i) Les traitements dits endovésicaux

Un traitement endovésical comprend soit une immunothérapie par BCG² [5, 6], soit une chimiothérapie par mitomycine C.

L'immunothérapie endovésicale par BCG est probablement le principal progrès réalisé ces dernières années dans le traitement des tumeurs superficielles urothéliales. Ce traitement permet de retarder ou d'empêcher l'infiltration tumorale. Pour les tumeurs superficielles, le taux global de réponse au BCG est d'environ 70%. Néanmoins pour les 30% restant, on observe que la tumeur évolue vers une infiltration [5-9].

ii) Les traitements systémiques

Si on regarde du côté des agents antitumoraux conventionnels, ils sont répertoriés selon quatre grandes familles et possèdent une action non spécifique : on recense ainsi ceux responsables de lésions directes sur l'ADN, ceux créant des lésions sur l'ADN via une interaction avec une topoisomérase, les inhibiteurs de synthèse d'ADN et enfin les poisons du faisceau mitotique.

Il sera bien évidemment plus judicieux d'associer des médicaments ayant des cibles biochimiques différentes pour induire une cytotoxicité la plus forte possible dans la cellule saine, tout en limitant les effets toxiques sur les cellules saines. Dans cette optique, on peut envisager de combiner des agents inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques, avec des poisons du faisceau mitotique ou des intercalants /alkylants de l'ADN.

Du point de vue biologique, l'apparition de tumeurs au sein d'un organe est le résultat d'un ensemble de modifications comportementales de la cellule dues à des mutations intervenant sur différentes fonctions régulatrices ou non de la cellule [10]. De plus, ces cellules prolifèrent de manière incontrôlée au sein d'un tissu. On va donc chercher dans un premier temps à stopper ce processus en sachant qu'à priori le tissu tumoral est beaucoup plus sensible que le tissu sain à l'action de médicaments.

¹ Systémique : se dit d'une substance active qui pénètre puis migre à l'intérieur du corps humain.

² Immunothérapie par BCG : il s'agit de mettre en contact le Bacille Calmette Guérin avec la tumeur, par instillations endovésicales.

Un mode de traitement a donc consisté à imposer au malade une forte dose thérapeutique d'un agent antitumoral en supposant que, suite à ce stress, le tissu sain se reconstruira plus rapidement et plus facilement que le tissu cancéreux. On verra par la suite que l'utilisation d'une monothérapie n'est pas appropriée et qu'il vaut mieux se diriger vers une polythérapie.

Pour la chimiothérapie par voie systémique les molécules efficaces dans le cancer urothélial sont les agents antitumoraux Cisplatine, Méthotrexate, Vinblastine, Adriamycine, Paclitaxel et Gemcitabine. Actuellement, le protocole de référence en situation métastatique est le protocole GC (Gemcitabine et Cisplatine). L'autre polythérapie très utilisée est le MVAC combinant Méthotrexate, Vinblastine, Adriamycine (plus couramment appelée Doxorubicine) et Cisplatine. Chaque constituant présente un mode d'action sur les cellules cancéreuses spécifique dont les mécanismes sont relativement bien connus. De plus, il a été récemment démontré que cette polythérapie MVAC combinée à une cystectomie totale de la vessie permet dans une bonne proportion d'éliminer les cancers résiduels et augmente les chances de survie des patients présentant localement un cancer avancé de la vessie [11, 12].

Un des points faibles de cette polychimiothérapie est la forte cytotoxicité de certains des agents antitumoraux qui la composent. Néanmoins, il est tout à fait envisageable de diminuer considérablement cette toxicité en recourant à un facteur de croissance de l'hématopoïèse « granulocytes colony stimulating factor » (hormone stimulant l'hématopoïèse des polynucléaires neutrophiles) [13]. Par conséquent, la polythérapie MVAC a été et reste un traitement de référence, très utilisée en première et deuxième intention : c'est elle qui a été étudiée dans le cadre de ce travail.

L'aspect thérapeutique de la chimiothérapie anticancéreuse est malheureusement indissociable d'un aspect cytotoxique puisque souvent les cellules saines peuvent aussi être détruites par le traitement (effets secondaires). La chimiothérapie constitue donc un mode de traitement à double tranchant. En conséquence, son mode d'utilisation et les agents choisis pour cette thérapie doivent être particulièrement pertinents et efficaces pour minimiser les effets secondaires chez le patient et ainsi maximiser ces chances de survie.

III.2.3. La résistance aux agents chimiothérapeutiques dans les tumeurs urinaires

On peut distinguer trois types de tumeurs : celles qui répondent complètement et rapidement à la chimiothérapie, celles qui présentent une forte sensibilité aux agents antitumoraux au début du traitement mais qui, progressivement, vont développer une résistance, entraînant une récurrence avec des tumeurs peu ou pas chimiosensibles et celles qui sont intrinsèquement peu sensibles aux traitements médicamenteux.

La résistance aux agents antitumoraux est un processus complexe multifactoriel. Elle peut faire intervenir différents mécanismes : ceux qui limitent l'accès des agents antitumoraux à leurs cibles primaires ou altèrent les propriétés de ces cibles, ceux qui favorisent la réparation des dommages induits et enfin ceux qui génèrent une tolérance à ces dommages [14]. Leur mise en place est étroitement liée aux remaniements génétiques qui accompagnent et conditionnent la progression tumorale. L'émergence des clones résistants est sans doute liée à l'hyper mutabilité intrinsèque des cellules tumorales et traduit l'extraordinaire plasticité des cellules cancéreuses pour résister aux agressions externes. Les altérations des systèmes de contrôle de cycle cellulaire et de l'apoptose contribuent également à leur survie en présence de dommages induits par les agents antitumoraux.

III.2.3.1. Mécanismes généraux de résistance aux agents antitumoraux du MVAC

Il a été établi précédemment que la polythérapie combinant les agents antitumoraux méthotrexate, vinblastine, doxorubicine et cisplatine (MVAC) est utilisée pour le traitement des carcinomes urothéliaux. Malheureusement, la réponse à ce traitement est limitée dans le temps à cause de l'apparition de résistances aux agents antitumoraux. Plusieurs mécanismes sont impliqués [15] :

-L'amplification et la surexpression du gène codant pour la réductase dihydrofolate engendreront une résistance au méthotrexate.

-La résistance au cisplatine comporte de nombreux mécanismes dont le principe est commun aux autres familles d'agents antitumoraux [16] : modification de l'accumulation du médicament au sein de la cellule due à l'inhibition de l'internalisation du médicament ou à l'augmentation de l'efflux cellulaire, augmentation de la concentration de certaines entités intracellulaires comme les métallothionéines (responsable de la détoxification des métaux lourds au sein des cellules) ou augmentation de la capacité à réparer les dommages subis par l'ADN.

-Enfin, la doxorubicine et la vinblastine sont des substrats des protéines de membrane (pompe membranaire) comme la glycoprotéine P et les protéines associées à la MDR qui externalisent les agents antitumoraux des cellules résistantes avant qu'ils puissent développer leur cytotoxicité (efflux cellulaire). De plus, la doxorubicine exerce son effet cytotoxique en stabilisant les complexes formés entre les parties d'ADN ayant subi une coupure et l'enzyme responsable de ces coupures, la topoisomérase II. La formation et la stabilisation de ce complexe empêchent de rétablir la structure de l'ADN. La réduction de l'activité de la topoisomérase II sera à l'origine d'un autre type de résistance.

Schématiquement, on peut distinguer trois grands types de résistance communs aux agents antitumoraux étudiés ici. La résistance multidrogue (ou MDR) dépendant des transporteurs membranaires comme la glycoprotéine P, celle associée aux anti-topoisomérases et celle associée aux enzymes qui métabolisent le médicament au sein de la cellule.

La glycoprotéine P (P-gP) fait partie de la famille des protéines ATP-dépendantes et se comporte comme une pompe pour les médicaments hydrophobes. La P-gP est un complexe protéique transmembranaire capable d'exporter vers le milieu extracellulaire les agents antitumoraux usuels comme les anthracyclines (la doxorubicine et la vinblastine). Le mécanisme d'efflux est présenté sur la Figure III.2-2.

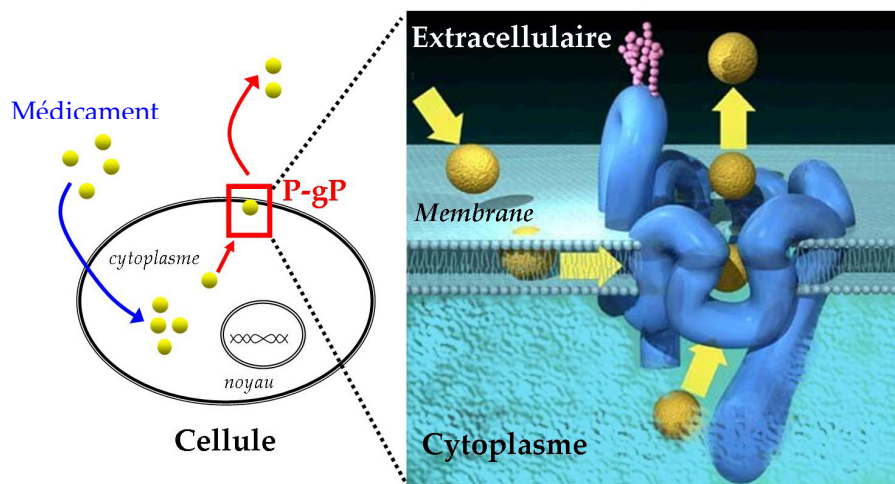


Figure III.2-2 : Schéma du mécanisme de résistance : Efflux moléculaire au niveau de la cellule et représentation 3D de la glycoprotéine P [17]

La MDR dépendant de la glycoprotéine P est alors associée à une augmentation de l'efflux des médicaments présents dans le cytoplasme et la membrane cytoplasmique ce qui engendre une diminution de la captation intracellulaire des médicaments.

De plus, récemment, le rôle des pores nucléaires dans le mécanisme de MDR a également été mis en évidence [18]. En effet, ils sont directement impliqués dans l'export du médicament hors du noyau. Or, il semblerait que le nombre de pores nucléaires soit plus important dans les cellules tumorales résistantes que dans les cellules saines et leur efficacité accrue.

On voit donc que le phénomène de résistance est un processus complexe faisant intervenir de nombreux mécanismes d'où la nécessité de disposer d'un large panel de techniques permettant de détecter les MDR.

III.2.3.2. Techniques existantes pour la détection de la MDR

Différentes techniques sont déjà disponibles pour évaluer la résistance des cellules cancéreuses à un traitement, ou plutôt à une famille d'agents antitumoraux. Ce genre de technologie nécessite de disposer de marqueurs fiables. Typiquement l'expression et l'activité de P-gP peuvent être évaluées de différentes façons. L'ARN codant pour la MDR peut être détecté par hybridation avec des sondes spécifiques. Et la protéine elle-même peut être détectée par Western Blot, immunofluorescence, immunohistochimie [19-22]. De même le transport trans-membranaire dépendant de la P-gP peut être évalué par mesure de l'efflux actif de substrats marqués ou radioactifs. Des travaux ont également été entrepris pour induire la réversion de la chimiorésistance par des chimiosensibilisateurs spécifiques [23]. Chaque méthode présente des difficultés intrinsèques. Typiquement les anticorps monoclonaux permettent de détecter la P-gP mais ne donnent pas d'information sur sa fonctionnalité. Il se peut aussi qu'ils ne marquent pas certaines cellules positives dans de grandes tumeurs hétérogènes. Les tests fonctionnels de chimiorésistance actuellement disponibles, qui mettent en évidence le mécanisme et la modulation de la résistance pour des tumeurs individuelles, nécessitent l'isolement de tumeurs viables et une quantification de l'efflux des substrats marqués et de la survie cellulaire. Il y a donc un réel enjeu au développement de nouveaux tests pour détecter les MDR, qui soient simples à la mise en place et à l'usage.

III.3. Etudes spectroscopiques du MVAC : de la solution au milieu cellulaire

L'association d'agents antitumoraux MVAC couramment administrés en polychimiothérapie des tumeurs infiltrantes urothéliales, en première ainsi qu'en deuxième intention (en traitement curatif ou pré ou post opératoire) est donc une combinaison de quatre molécules à large spectre d'action qui sont : les molécules méthotrexate, vinblastine, doxorubicine et cisplatine. Cependant, 30% des patients montrent une résistance primaire ou acquise à l'une ou plusieurs de ces molécules qu'il serait intéressant d'identifier en amont du traitement [24, 25].

Nous présenterons une première étude par microscopie de fluorescence confocale des propriétés photophysiques de la polythérapie MVAC en solution et en milieu cellulaire. Les résultats de cette étude ont mis en évidence une cinétique de pénétration et de localisation du MVAC dépendant du type de la cellule (le protocole de mise en culture est donné en Annexe C 2).

Ceci nous a permis d'identifier une signature spectroscopique spécifique discriminant les cellules résistantes des autres. Sur cette base, un nouveau test de dépistage d'une MDR *ex vivo* a été adapté pour être facilement utilisé en milieu hospitalier en utilisant un microscope d'épifluorescence conventionnel.

III.3.1. Présentation de la polythérapie MVAC

L'un des composés de la polythérapie MVAC, l'agent cisplatine (CDDP, Figure III.3-1) est un dérivé inorganique du platine [26]. Son hydrolyse aboutit à un dérivé bifonctionnel, le diaquoplatine, qui interagit avec les bases puriques (A ou G) de l'ADN, créant ainsi des ponts inter ou intracaténaux inhibant la réplication et la transcription de l'ADN. Le mécanisme d'hydrolyse est ici particulièrement rapide ce qui explique une grande toxicité tissulaire de ce composé (notamment au niveau du rein). Cette toxicité est cumulative et souvent irréversible. La dose prescrite en combinaison avec les trois autres agents est de l'ordre de 70 mg/m² soit 126 mg en considérant une surface corporelle moyenne de 1.8 m².

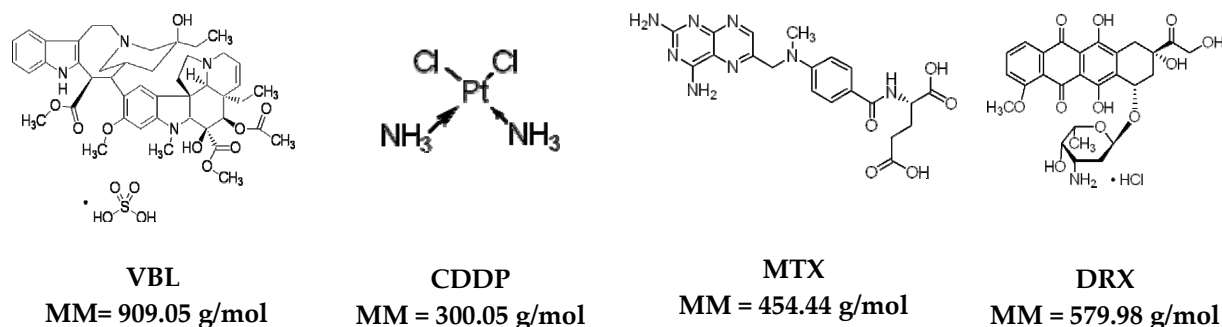


Figure III.3-1 : De gauche à droite : Structure chimique des quatre molécules composant l'association d'agents antitumoraux MVAC, respectivement les molécules vinblastine (VBL), cisplatine (CDDP), méthotrexate (MTX) et doxorubicine (DRX)

L'agent méthotrexate (MTX, Figure III.3-1), analogue structural de l'acide folique, interfère avec les voies métaboliques de la cellule en inhibant l'activité de l'enzyme, la dihydrofolate réductase, qui permet la conversion de l'acide folique en folates réduits. Ceci se traduit du point de vue métabolique par un blocage de la synthèse des purines et pyrimidines aboutissant à une diminution de la synthèse de l'ADN. La dose thérapeutique usuellement prescrite est de 30-50 mg/m² soit 54-90 mg.

La molécule vinblastine (alcaloïde dimère) se fixe sur la tubuline, inhibe l'assemblage des microtubules entraînant une dissolution du fuseau mitotique. La dose généralement prescrite est de 6-10 mg/m² soit 10.8 -11.8 mg.

Enfin, l'agent antitumoral adriamycine ou doxorubicine (DXR) prescrite à 60-75 mg/m² soit 108 – 135 mg appartient à la famille des anthracyclines. Depuis plus de 30 ans, elle et ses dérivés sont utilisés dans le traitement des tumeurs solides. Les multiples mécanismes d'actions associés à ces molécules sont liés à la concentration à laquelle elles sont utilisées [27]. Comme nous l'avons vu au paragraphe III.2.3.1, la doxorubicine réalise une liaison intercalante et forme avec l'ADN et la topoisomérase II un complexe. Elle s'intercale également dans l'ADN [28-31] : la partie cycle plan aromatique de la molécule s'intercale entre deux paires de base C-G ou G-C alors que le dérivé glycosidique se positionne dans le petit sillon du double brin [32], comme présenté sur la Figure III.3-2 pour l'anthracycline daunorubicine.

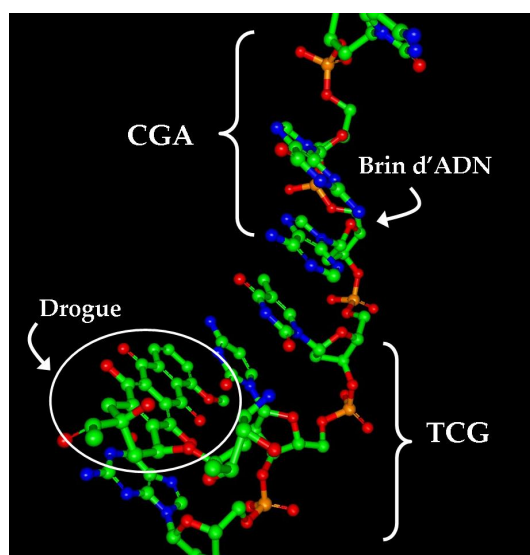


Figure III.3-2 : Structure en 3D de l'agent antitumoral daunomycine, molécule parent de la doxorubicine, qui diffère par un groupement hydroxy terminal, intercalé dans un brin d'ADN, séquence CGATCG (ref : Protein Data Bank, « DNA-drug interactions : the crystal structure of D(CGATCG) complexed with Daunomycin »)

Diverses études ont été réalisées sur ces quatre molécules en solution, afin d'identifier leur mode d'action ainsi que leurs propriétés photo-physico-chimiques. Notamment, la photochimie de la doxorubicine en solution n'est plus un secret depuis 20 ans [33, 34]. De plus, elle présente des propriétés photophysiques intéressantes qui seront utilisées dans le cadre de notre étude.

Rappelons également que les molécules antitumorales telles que la vinblastine, les ellipticines ou les anthracyclines présentent un atome d'azote faiblement basique dont le pKa de protonation est compris entre 7 et 8,5 [35]. Comme les milieux biologiques possèdent un pH proche de 7, ce type de molécules peut a priori exister sous 2 formes, neutre et protonée. Cet équilibre de protonation est susceptible d'être déplacé dès que ces composés interagissent avec les biopolymères de la cellule, lors des passages transmembranaires ou lors de leur accumulation dans des compartiments présentant un pH local spécifique. Le pH de nos études est proche de 7.

III.3.2. Propriétés spectroscopiques : De la solution.....

Avant d'envisager une étude en milieu cellulaire de l'activité de la polythérapie MVAC, une étude spectroscopique en solution des quatre médicaments isolés et combinés (MVAC) a été réalisée (mise en solution des agents décrite en Annexe C 3).

Les spectres d'absorption du cisplatine, du méthotrexate, de la vinblastine, de la doxorubicine et du MVAC sont présentés sur la Figure III.3-3. Le cisplatine et la vinblastine absorbent dans l'UV principalement, dans le domaine spectral compris entre 200 nm et 350 nm. La première transition électronique de la vinblastine est centrée à 270 nm.

On remarquera que le cisplatine présente un pied de bande qui s'étend jusqu'à 600 nm. Ce composé est difficilement soluble en milieu aqueux et peut s'agréger en solution. Par conséquent, le pied bande est sans doute dû à un effet de diffusion de la lumière par les agrégats moléculaires dans la solution.

Le méthotrexate présente trois bandes entre 250 nm et 370 nm dont les maxima se situent à 258 nm, 302 nm et 371 nm respectivement (Figure III.3-3). D'après la littérature, le coefficient d'extinction molaire à 371 nm est de $1780 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [36].

La première transition électronique S_0-S_1 de la doxorubicine est centrée à 488 nm et une deuxième bande d'absorption (transition S_0-S_2) débute à 330 nm. La première bande d'absorption présente une structure au niveau de son maximum et un épaulement vibrationnel à 535 nm ; d'après la littérature $\epsilon_{(480 \text{ nm})} = 11500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [37].

L'association de ces quatre molécules formant le MVAC, absorbe entre 200 nm et 650 nm en solution. La première bande d'absorption entre 410 nm et 630 nm est due à la contribution de la doxorubicine. Néanmoins, on observe une déformation de cette bande. La bande du mélange MVAC centrée à 490 nm est élargie de 12 nm par rapport à celle de la doxorubicine seule en solution. A cette longueur d'onde aucune autre molécule ne contribue à l'absorption. Par conséquent, on peut supposer que l'élargissement de cette bande d'absorption est dû à une interaction de la doxorubicine avec les autres agents antitumoraux. Le spectre du mélange MVAC présente une deuxième bande centrée à 377 nm correspondant à la contribution du méthotrexate.

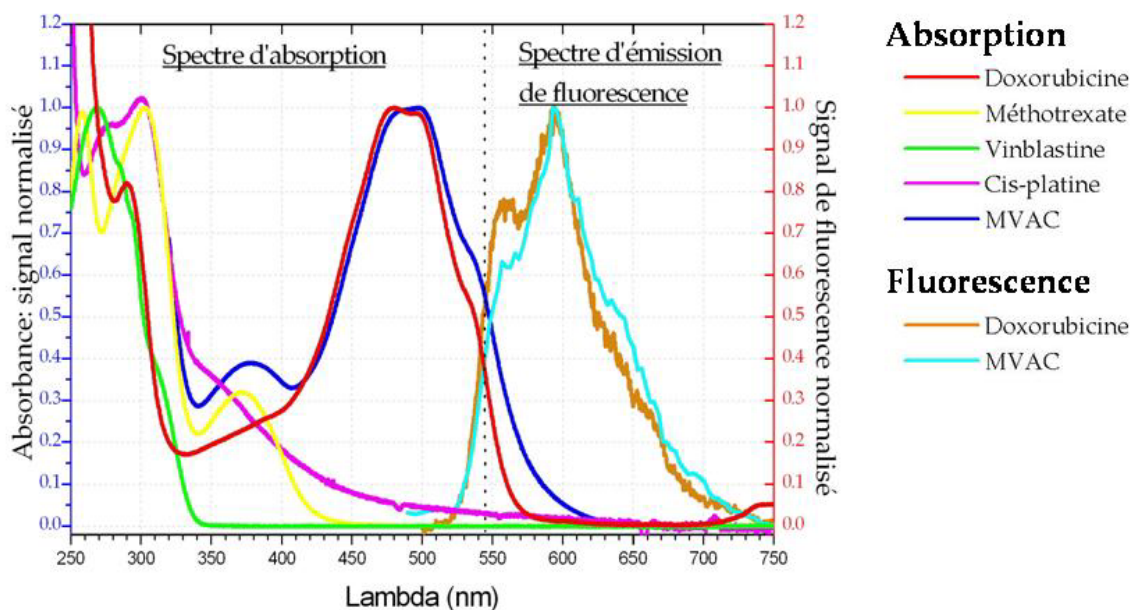


Figure III.3-3 : Spectres d'absorption normalisés à 1 des quatre médicaments seuls et du MVAC dans le PBS et spectres d'émission de la doxorubicine et du MVAC, $\lambda_{exc} = 488$ nm (avant l'enregistrement des spectres d'émission de fluorescence la solution étudiée a été diluée de façon à ce que son absorbance soit égale à 0,1).

Dans le domaine de longueur d'onde accessible avec notre dispositif de microscopie confocale (soit dans le domaine spectral situé au delà de 350 nm), seuls deux des quatre médicaments peuvent être excités : les molécules méthotrexate et doxorubicine. Des données de la littérature ont révélé qu'à température ambiante le signal de fluorescence (maximum d'émission à 470 nm) émis par l'agent méthotrexate était très peu intense [36].

Nous avons vérifié cette donnée en excitant, avec la raie laser 364 nm du laser Argon, des cellules incubées avec le mélange MVAC. Ce test rapide a révélé qu'il était impossible de distinguer le signal de fluorescence de la molécule méthotrexate du signal des fluorophores endogènes.

Par conséquent, seule la fluorescence de la doxorubicine a été étudiée. Son spectre d'émission en solution a été enregistré entre 500 et 750 nm après une excitation avec la raie laser 488 nm du microscope confocal (Annexe C 4). La doxorubicine possède deux pics d'émission de fluorescence centrés à 560 nm et 594 nm avec un épaulement à 635 nm (Figure III.3-3).

Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation utilisée (480 nm, 488 nm ou 498 nm), la forme du spectre est inchangée. D'après ce résultat, on peut en conclure que les structures observées sur le spectre d'émission ne sont pas dues à la présence de plusieurs espèces fluorescentes en solution mais à la structure vibrationnelle d'une seule forme moléculaire fluorescente.

L'émission de fluorescence de la doxorubicine au sein du mélange MVAC a été enregistrée entre 500 et 750 nm en excitant la solution avec la raie laser 488 nm. L'allure du spectre obtenu est semblable à celle du spectre d'émission de la doxorubicine seule (Figure III.3-3). Cependant, l'intensité du pic à 560 nm est plus faible pour le mélange MVAC que pour la doxorubicine seule alors que l'intensité de l'épaulement à 630 nm est plus élevée. Ce résultat confirme les données de spectroscopie d'absorption révélant une interaction entre l'agent doxorubicine et les autres composés du mélange MVAC.

Les durées de vie de fluorescence en solution de la doxorubicine seule et de la doxorubicine au sein du mélange MVAC ont également été déterminées. Celles-ci ont été mesurées à l'aide du système confocal multimodal en mode microscopie à deux photons (Annexe C 4).

Le déclin de fluorescence de la doxorubicine seule en solution peut être ajusté par une monoexponentielle correspondant à une durée de vie de $1,0 \pm 0,1$ ns (Figure III.3-4 A). Au sein de la polythérapie MVAC, la durée de vie de la doxorubicine est identique soit $1,1 \pm 0,1$ ns (Figure III.3-4 B) et n'est donc pas influencée par la présence des autres médicaments.

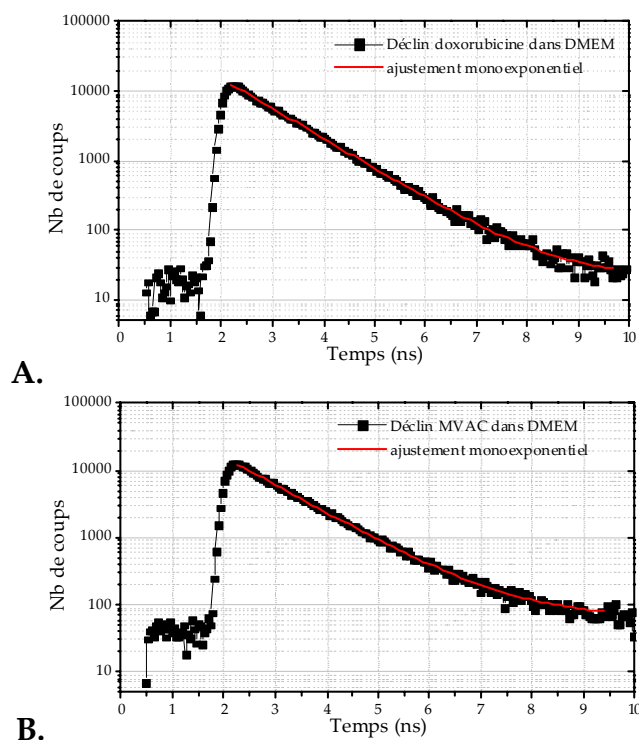


Figure III.3-4 : A. Déclin de la doxorubicine en solution (milieu de culture DMEM)) temps d'acquisition 30 s, B. Déclin du MVAC en solution et ajustement (rouge) monoexponentiel; paramètres expérimentaux : $\lambda_{exc}=800$ nm, puissance moyenne du faisceau incident environ 5 mW dans le plan focal arrière de l'objectif, intervalle de détection compris entre 500 nm et 750 nm

Stabilité de l'association d'agents antitumoraux MVAC

Il a été vérifié que le mélange d'agents MVAC était stable en restant 8h dans l'incubateur (CO_2 à 5%, 37 °C saturé en humidité) et après plusieurs heures d'expositions au faisceau laser 488 nm du microscope confocal (Annexe C 5). Ceci a pu être établi en vérifiant qu'il n'y avait aucune variation des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la polythérapie MVAC au cours du temps.

Le seul inconvénient majeur constaté est une précipitation de la doxorubicine dans le milieu de culture à trop forte concentration et ce après environ une heure d'incubation. Une nouvelle solution a donc été préparée pour chaque série d'expériences.

A présent que nous avons en main les caractéristiques spectroscopiques de nos différentes molécules antitumorales composant le mélange MVAC étant désormais connues, regardons leur comportement en milieu cellulaire.

III.3.3. ...Aux résultats en milieu cellulaire

Les propriétés de fluorescence de la doxorubicine ont déjà été utilisées pour des études de localisation dans des cellules cancéreuses de poumons et des lignées cellulaires humaines du myélome faites par De Lange et al. [38] ainsi que lors d'études menées par Lou et al [23] pour tenter d'inverser le processus de résistance au sein de cellules présentant une MDR.

La pharmacodynamique de la doxorubicine a été étudiée par Y. Gan et al [39] par histoculture de prélèvements chirurgicaux de tumeurs superficielles et invasives. Ils ont démontré que le médicament engendre après deux heures d'incubation une inhibition de la prolifération cellulaire qui dépend de la concentration utilisée.

Aucune étude par microscopie de fluorescence du mélange MVAC en milieu cellulaire n'est a priori répertoriée.

Les travaux de De Lange et al ont montré qu'en milieu cellulaire la doxorubicine pouvait se localiser différemment selon que les cellules présentaient ou non une MDR.

Dans le cas des lignées cellulaires sensibles à ce traitement, l'intensité de fluorescence est essentiellement localisée dans le noyau de la cellule, contrairement aux lignées résistantes pour lesquelles le signal de fluorescence provenant du noyau est très faible.

A partir de ces résultats, nous avons mené une étude sur l'émission de fluorescence de la doxorubicine au sein de la polythérapie MVAC par microscopie confocale. Néanmoins pour chaque aspect de cette étude, un travail préliminaire réalisé avec la doxorubicine seule sera présenté pour servir de référence. Ces études en milieu cellulaire ont été réalisées avec cinq lignées cellulaires urothéliales humaines: une lignée cancéreuse sensible aux agents antitumoraux "Massachusetts General Hospital urothelial 1 sensitive" (noté dans le suite du manuscrit MGHu1S), son pendant résistant aux polychimiothérapies (noté par la suite MGHu1R), une lignée non cancéreuse issue de tissu sain de l'uretère SV-HUC-1 (nommé HUC1) et son pendant cancéreux MC-SV-HUC T-2 (noté HUCT2) ainsi qu'une lignée cellulaire issue d'un carcinome urothélial transitionnel T24 (caractéristiques de toutes les lignées cellulaires en Annexe C 2).

La dose optimum pour l'observation de la polythérapie MVAC dans les cellules et le temps d'incubation le plus adapté pour avoir le meilleur contraste en imagerie de fluorescence seront déterminés dans un premier temps, en essayant d'évaluer l'influence des autres médicaments sur l'intensité de fluorescence de la doxorubicine au sein du mélange MVAC.

III.3.3.1. Evaluation des doses d'agents antitumoraux à utiliser

Détermination de la concentration en doxorubicine

Pour l'étude de la localisation de la doxorubicine au sein des cinq types cellulaires décrits précédemment par microscopie de fluorescence confocale, nous nous sommes basés sur les résultats répertoriés dans la littérature [40]. Une gamme de concentration s'étendant de 1 μM à 200 μM a été testée. Les concentrations inférieures à 5 μM ne permettent pas d'obtenir un signal de fluorescence suffisamment distinct de celui relatif à l'autofluorescence cellulaire. Pour les concentrations 6 μM , 20 μM , 60 μM ou 200 μM , la répartition de la doxorubicine au sein des cellules est identique. Aucun effet de concentration n'a été observé sur la localisation (Figure III.3-5 D).

Le meilleur compromis entre intensité du signal de fluorescence, réponse des lignées cellulaires et données de la littérature se trouve dans l'utilisation d'une concentration de 20 μM pour l'étude de la doxorubicine seule.

Détermination de la concentration en MVAC :

Des travaux antérieurs à ma thèse, réalisés avec le MVAC, ont permis de déterminer les doses permettant d'avoir le taux de survie cellulaire le plus bas possible. Une étude a notamment été réalisée sur la lignée T24 pour tester l'efficacité des quatre agents tumoraux pris séparément en milieu cellulaire [40]. Elle a permis d'établir que, pour les molécules doxorubicine, cisplatine et vinblastine à partir de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, le taux de survie à 4h est proche de 0% et que pour le méthotrexate, dans les mêmes conditions, on peut obtenir au mieux un taux de survie de 20 à 30%. Ainsi, lorsque la polythérapie MVAC est administrée à un patient, chacun des agents est injecté à une concentration qui tient compte de son efficacité. Les doses thérapeutiques sont rappelées dans le Tableau III.3-1. On remarque qu'il existe un facteur cinq entre la masse de vinblastine administrée en thérapie et celle de méthotrexate, et un facteur dix entre les masses de vinblastine et de doxorubicine ou de cis-platine.

Vinblastine	6 – 10 mg/m^2 soit 2.2 – 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Méthotrexate	30 – 50 mg/m^2 soit 10.8 – 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Cisplatine	70 mg/m^2 soit 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Doxorubicine	60 – 75 mg/m^2 soit 21.6 – 27 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tableau III.3-1 : Doses thérapeutiques prescrites aux patients pour chacun des agents antitumoraux

A partir de ces données, il faudra trouver une dose de MVAC qui sera un bon compromis entre efficacité des agents antitumoraux, en cohérence avec les doses utilisées en thérapie et un bon contraste en intensité de fluorescence.

Les doses testées lors de ce travail sont répertoriées dans le tableau de la Figure III.3-5. Une gamme de concentration, autour de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a d'abord été établie pour la vinblastine avant de définir celle des autres agents antitumoraux.

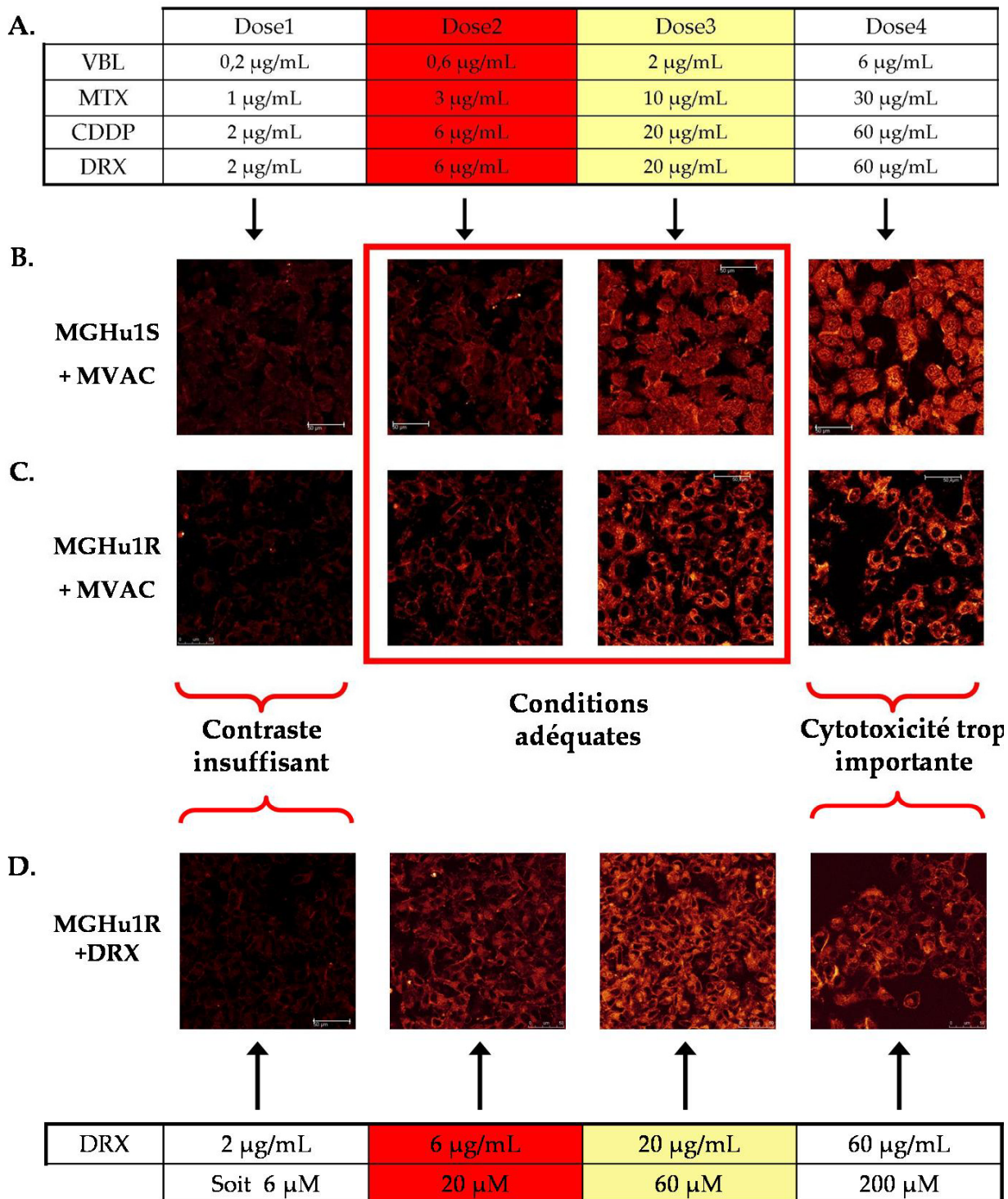


Figure III.3-5 : Détermination de la dose optimale pour mener notre étude : A. Equivalent des doses thérapeutiques utilisées en $\mu\text{g}/\text{mL}$; Images d'intensité à $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ après 2 h d'incubation avec le MVAC pour les 4 doses testées : B Pour les cellules sensibles MGHu1S ; C. Pour les cellules MGHu1R ; D Images d'intensité de fluorescence des cellules MGHu1R incubées 2h avec la doxorubicine seule

Nous avons par conséquent testé quatre doses différentes du mélange MVAC sur deux lignées cellulaires : MGHu1S et MGHu1R (Figure III.3-5). Les images d'intensité de fluorescence correspondantes sont représentées respectivement sur la Figure III.3-5 B et C.

D'après la Figure III.3-5, la première concentration (dose 1) ne pourra être retenue car les images d'intensité ne sont pas assez contrastées. Et pour la dernière concentration (dose 4), nous avons constaté que la cytotoxicité était trop importante. Par conséquent, seules les « doses 2 et 3 » sont adaptées à notre étude.

On remarque que la « dose 3 » est plus proche de la dose thérapeutique. Néanmoins, les doses thérapeutiques indiquées correspondent aux doses injectées au patient par intraveineuses et ne sont donc pas représentatives de la dose effective « vue » par les cellules de la tumeur, généralement inférieure à la dose injectée. Nous opterons donc pour la « dose 2 » pour laquelle nous avons un bon contraste en intensité de fluorescence:

III.3.3.2. Suivi au cours du temps de l'intégration et de la localisation de l'agent antitumoral par microscopie confocale

L'intégration de la doxorubicine seule ou combinée avec les autres antitumoraux du MVAC a été suivie au cours du temps. Les points de mesure ont été enregistrés à 5, 15, 30 min, 1 h, 1h30, d'incubation des cellules avec les antitumoraux, puis toutes les heures jusqu'à 4 h. Au delà, à la dose utilisée, les cellules ont un faible taux de survie.

Cas de l'agent doxorubicine seul :

L'évolution de l'intensité de fluorescence de la doxorubicine dans les cellules a été suivie par imagerie confocale en excitant à 488 nm (images d'intensité de fluorescence présentées sur la Figure III.3-6). Nous présenterons uniquement les résultats obtenus pour les lignées cellulaires HUC1, HUCT2, MGHu1S et MGHu1R puisque ceux obtenus avec la lignée cellulaire T24 sont similaires de ceux obtenus pour la lignée MGHu1S.

Pour illustrer l'intégration de l'agent antitumoral, nous avons représenté, sur la Figure III.3-6 A, les images d'intensité de fluorescence enregistrées à différents temps pour les cellules résistantes MGHu1R. Entre 0 et 30 min, la fluorescence provient essentiellement de la membrane cytoplasmique et le signal détecté est très faible par rapport à l'intensité de fluorescence mesurée dans le cytoplasme des autres lignées cellulaires. A $t = 1$ h, l'intensité de fluorescence augmente légèrement dans le cytoplasme avec un début d'accumulation périnucléaire. Jusqu'à 4 h, la doxorubicine continue à s'accumuler progressivement dans le cytoplasme sans passer la membrane plasmique du noyau. De plus, pour cette lignée cellulaire, il a été vérifié qu'après 24 h d'incubation avec le médicament les cellules continuaient leur cycle de division et que l'intensité de fluorescence restait faible dans le noyau.

Pour quantifier l'intégration de la doxorubicine au sein des différentes lignées cellulaires, l'intensité moyenne de fluorescence dans le cytoplasme et dans le noyau a été tracée en fonction du temps d'incubation. Cette moyenne a été effectuée sur deux expériences différentes et sur une vingtaine de cellules (Figure III.3-6) à chaque fois (soit $n = 40$).

A partir de ces courbes, on constate que la quantité de doxorubicine présente dans le cytoplasme des cellules résistantes (en cyan sur la Figure III.3-7 B) est sensiblement équivalente à celle observée dans les cellules sensibles MGHu1S et les cellules HUC1. Par contre, la courbe de la Figure III.3-7 A confirme que la doxorubicine ne pénètre pratiquement pas dans le noyau des cellules résistantes.

Les cellules HUC1 et MGHu1S présentent une évolution de l'intensité de fluorescence dans le noyau et le cytoplasme très proche. Celle-ci augmente linéairement en fonction du temps que ce soit dans le noyau ou dans le cytoplasme. On n'observe pas de seuil de saturation.

Au contraire, pour les cellules HUCT2, l'intensité de fluorescence intracellulaire (noyau et cytoplasme) est plus élevée que pour les autres cellules et atteint un seuil de saturation à 4 h. A la vue des résultats de la Figure III.3-7, cette lignée cellulaire est celle qui intègre le mieux la doxorubicine.

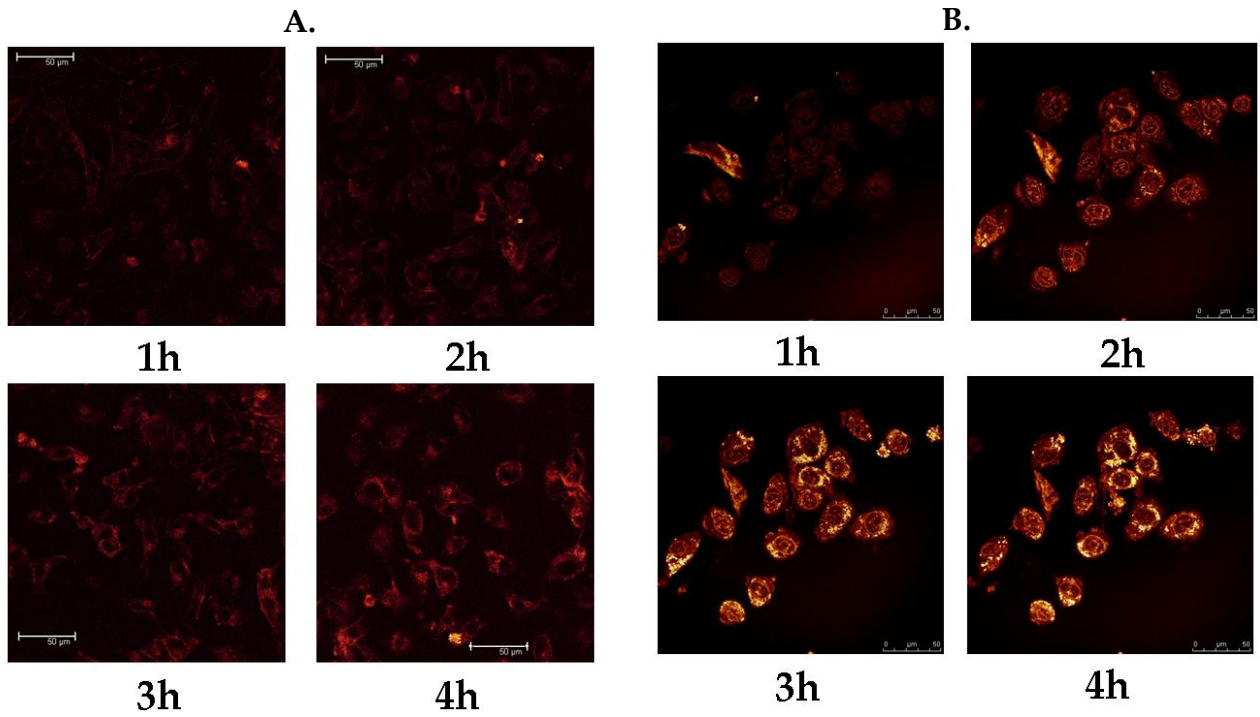


Figure III.6 : Suivi de l'intégration à différents temps (1 h à 4 h) : A. De la doxorubicine ($[DRX] = 20 \mu M$) dans les cellules MGHu1R et B. Du MVAC à la dose 2 dans les cellules sensibles MGHu1S, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; intervalle de détection de la fluorescence [510-750nm].

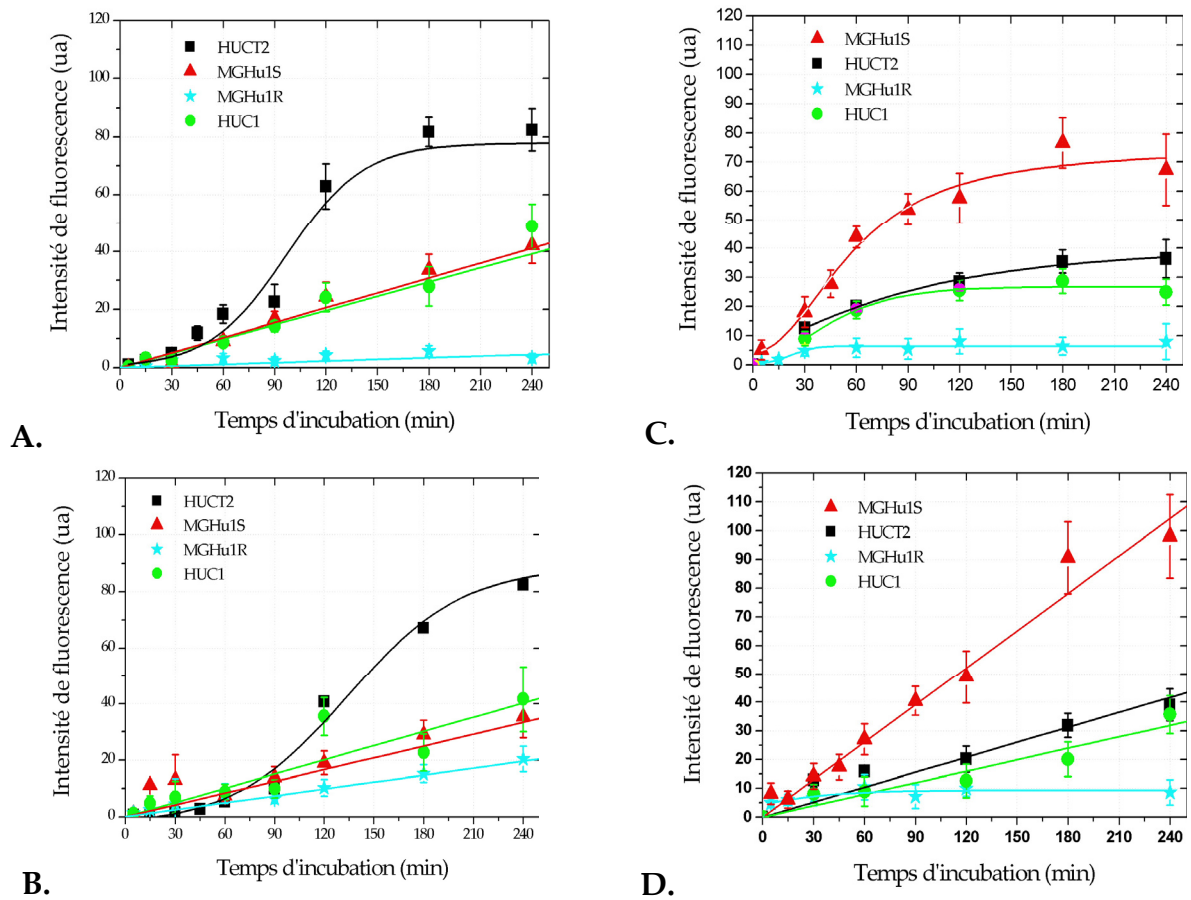


Figure III.7 : Intensité de fluorescence moyenne mesurée au sein des cellules HUC1, HUCT2, MGHu1S et MGHu1R en fonction du temps d'incubation : pour une concentration en doxorubicine de $20 \mu M$: A. dans le noyau, B. dans le cytoplasme et pour une concentration en MVAC égale à la dose 2 : C. dans le noyau, D. dans le cytoplasme ; $\lambda_{exc} = 488 \text{ m}$, intervalle de détection [500-750 nm].

Au delà de 6 h d'incubation, nous considérons que nos cellules ne sont plus viables [40] : une observation des cellules, après 24 h d'incubation, a montré que pour une concentration en doxorubicine de 20 μM , la majorité des cellules étaient mortes sauf celles de la lignée résistante.

Suite aux résultats obtenus lors du suivi de l'intégration du médicament, il va être intéressant de spécifier la localisation du médicament après deux heures d'incubation au sein des différentes lignées cellulaires. La Figure III.3-8 illustre la répartition de l'intensité de fluorescence de la doxorubicine au sein des quatre lignées cellulaires pour une dose de 20 μM deux heures après l'injection du médicament dans le milieu. Les lignées cellulaires MGHu1S, HUC1 et HUCT2 (Figure III.3-8 A, B et C), bien que de nature différente, présentent une localisation du médicament similaire avec une forte intensité de fluorescence dans le cytoplasme en périphérie du noyau (dans les organelles de la cellule) et dans la membrane nucléaire. Une étude menée par l'équipe de R.F. Novak permet d'expliquer cette observation en montrant que la doxorubicine forme des complexes avec les dérivés flaviniques FMN (flavine mononucléotide) et FAD (flavine adénine dinucléotide) avec une stoechiométrie de 1 : 1 (π - π ring stacking) [41].

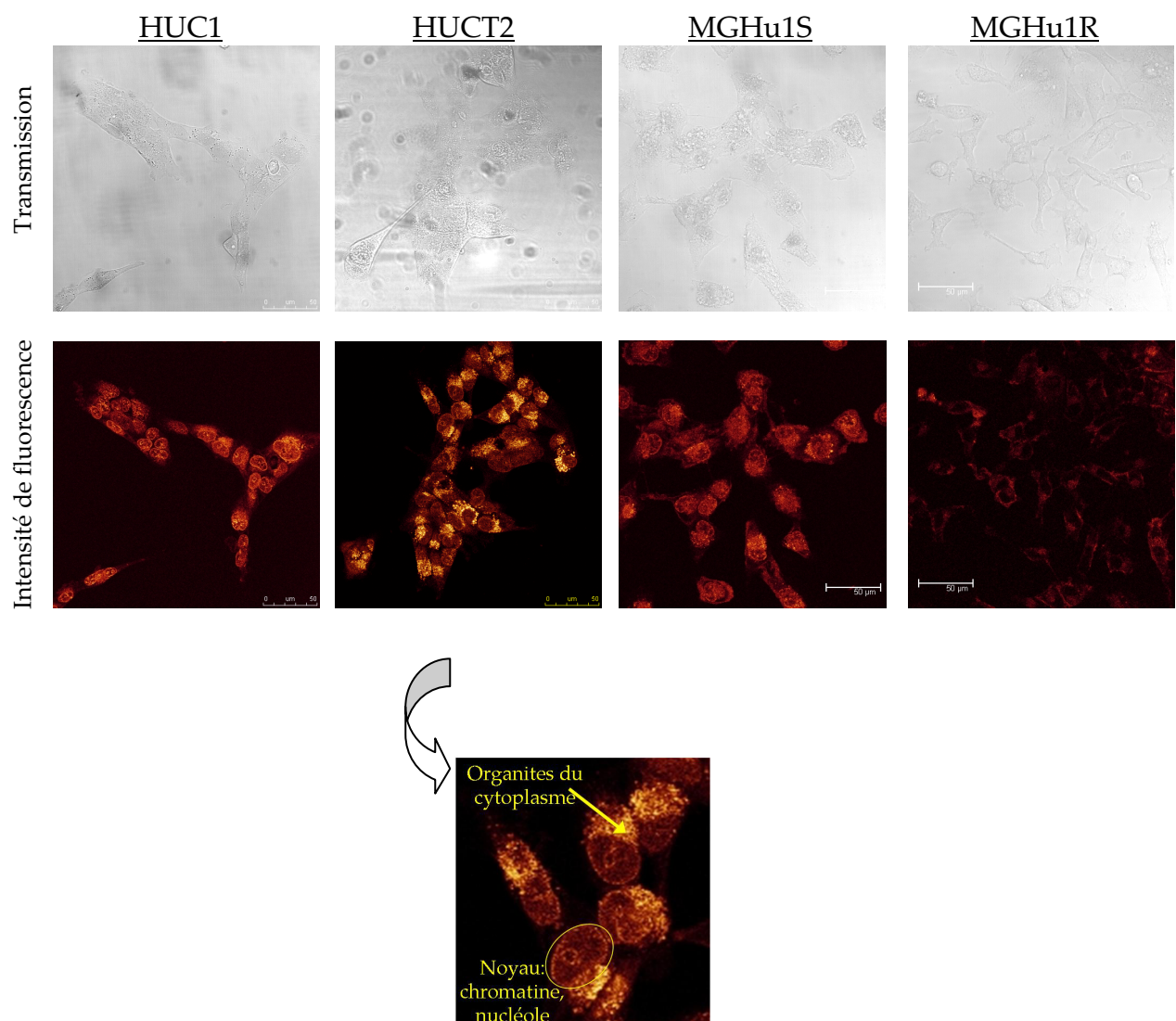


Figure III.3-8 : Images en transmission et images d'intensité de fluorescence des quatre lignées cellulaires (HUC1, HUCT2, MGHu1R et MGHu1S) incubées 2 h avec 20 μM de doxorubicine ; $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, intervalle spectral de détection [500 nm – 750 nm]

Comme nous l'avons vu précédemment, le médicament s'accumule également dans le noyau. Nous pouvons préciser cette localisation : d'après des données de la littérature, la molécule doxorubicine se localise préférentiellement au niveau de la chromatine et des histones [42] plutôt qu'au niveau des nucléoles.

Un résultat également intéressant, que l'on retrouve chez les cellules MGHu1R, est l'accumulation du médicament au niveau de la membrane cytoplasmique et nucléaire. Ce phénomène peut être expliqué par l'affinité que possède la doxorubicine pour certains lipides. En effet, la doxorubicine développe naturellement des interactions avec des phospholipides (comme les phosphatidylcholines) de la bicouche lipidique des membranes mitochondriales [43-45] et cytoplasmiques.

En conclusion, il est possible de discriminer les cellules résistantes des autres lignées cellulaires en regardant l'évolution de l'intensité de fluorescence intracellulaire à partir de deux heures d'incubation avec la doxorubicine en particulier au niveau du noyau.

Observe-t-on le même effet si les cellules sont incubées avec la doxorubicine et les autres agents antitumoraux du MVAC à la dose définie précédemment ? Est-ce que la présence des trois agents (méthotrexate, cisplatine et vinblastine) influence la localisation de la doxorubicine ?

Cas de l'agent doxorubicine au sein de MVAC :

Les images d'intensité de fluorescence du mélange MVAC obtenues avec les cellules sensibles MGHu1S à différents temps d'incubation sont présentées sur la Figure III.3-7 B.

L'émission de fluorescence de l'agent doxorubicine au sein du mélange MVAC est d'abord observée au niveau de la membrane cytoplasmique. Une fois celle-ci franchie, la doxorubicine transite par le cytoplasme avant de passer dans le noyau. A partir de là une accumulation continue du médicament commence à être observée après 1 h d'incubation, en périphérie du noyau et au niveau de la membrane nucléaire. L'augmentation du signal de fluorescence est plus conséquente en périphérie du noyau qu'à l'intérieur du noyau à partir de 2 h d'incubation. Il est possible que le noyau possède un seuil de saturation, alors que le cytoplasme intègre en continu le médicament. Ceci expliquerait l'allure sigmoïdale de la courbe donnant l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'incubation (ajustement représenté sur la courbe en trait plein rouge sur la Figure III.3-7 C).

D'après cette courbe, l'évolution de l'intensité de fluorescence dans le cytoplasme peut être considérée comme linéaire à partir de 30 min (ajustement sur la Figure III.3-7 D en trait plein rouge). A partir de 2 h d'incubation, on a un bon contraste entre la fluorescence du noyau et la fluorescence du cytoplasme pour la lignée cellulaire sensible.

Les deux lignées HUCT2 et HUC1 présentent une évolution de l'intensité de fluorescence de la doxorubicine au sein du MVAC similaire pour le noyau et pour le cytoplasme. La variation de l'intensité de fluorescence dans le cytoplasme est linéaire pour les deux lignées à partir de $t = 30$ min (Figure III.3-7 D ajustement linéaire en trait plein noir). Le médicament s'accumule continûment dans le cytoplasme. Par contre, l'évolution de la fluorescence du médicament dans le noyau est plus proche d'une sigmoïde, comme dans le cas des cellules MGHu1S (ajustement simulé par la courbe en trait plein noir sur la Figure III.3-7 C). Par conséquent, on peut définir une concentration limite dans le noyau.

Pour les cellules résistantes, l'évolution de l'intensité de fluorescence, en fonction du temps d'incubation, dans le noyau est identique à celle observée lors de l'étude de la doxorubicine seule : l'accumulation dans le noyau de la doxorubicine est très faible même lorsqu'elle est combinée à trois autres agents antitumoraux. Par contre dans le cytoplasme, l'intensité de fluorescence n'augmente pas en fonction du temps d'incubation comme cela a pu être observé lors de l'étude de la doxorubicine seule.

Après 4 h, l'intensité de fluorescence dans le cytoplasme des cellules résistantes est dix fois moins importante que celle dans le cytoplasme des cellules sensibles.

L'ajout des trois autres agents antitumoraux semble avoir une influence sur l'intégration de la doxorubicine. Néanmoins, le temps d'incubation idéal pour pouvoir distinguer les cellules résistantes des autres types cellulaires reste identique à celui déterminé lors de l'étude de la doxorubicine seule, soit une incubation de deux heures.

Le meilleur contraste sera obtenu en comparant les intensités de fluorescence du noyau. On estime qu'il y a un facteur 6 à 10 entre l'intensité de fluorescence dans le noyau des cellules sensibles MGHu1S et celle des cellules résistantes MGHu1R et un facteur 3-5 entre l'intensité dans le noyau des cellules HUCT2 (et HUC1) et celle des cellules MGHu1R.

La Figure III.3-9 présente les images d'intensité de fluorescence obtenues pour les quatre lignées cellulaires incubées pendant deux heures avec la polythérapie MVAC à la dose 2 et illustre que l'on peut aisément distinguer les cellules tumorales résistantes des autres types cellulaires, dans les conditions expérimentales que nous nous sommes fixées.

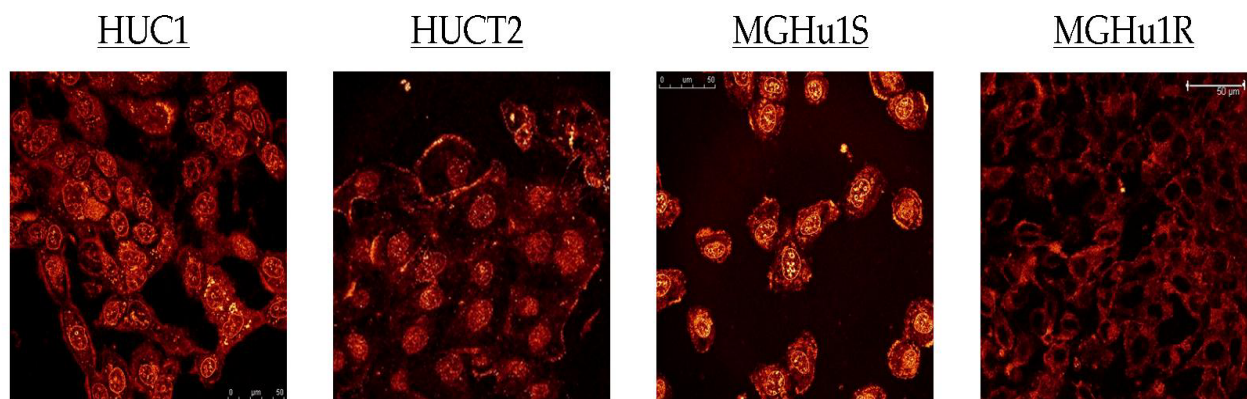


Figure III.3-9 : Images d'intensité de fluorescence pour les quatre lignées incubées pendant 2 h avec le mélange MVAC à la dose 2, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, intervalle de détection de la fluorescence [500-750 nm]

Finalement, les seules différences observables lors de l'ajout des trois autres agents antitumoraux à la doxorubicine sont d'ordre cinétique.

Supposons que l'un des agents pénètre plus facilement et plus rapidement dans un type cellulaire que les autres, cela peut éventuellement influencer la vitesse de pénétration des autres agents au sein de la cellule.

Ceci pourrait expliquer les différences observées dans le processus d'intégration de la doxorubicine selon qu'elle est employée seule ou en combinaison avec d'autres médicaments. Néanmoins il est difficile de trouver dans la littérature des travaux relatant les interactions entre les différents agents composant une polythérapie et l'influence réciproque sur leur pénétration au sein de la cellule.

Nous allons essayer de préciser les domaines de localisation de la doxorubicine en utilisant des marqueurs spécifiques des entités intracellulaires.

III.3.3.3. Colocalisation

Il a été montré que les molécules dérivées des anthracyclines se concentrent dans les organelles du cytoplasme comme les mitochondries [35] et se lient à l'ADN du noyau. Nous allons vérifier si ce résultat se confirme pour les lignées cellulaires urothéliales que nous avons étudiées. Pour ce faire, nous allons utiliser un marqueur du noyau, le colorant Hoechst 34580 (Molecular Probes, Invitrogen), qui se lie à tous les acides nucléiques et dont le signal de fluorescence est exalté lorsqu'il se lie aux brins d'ADN riche en bases AT (les brins d'ADN riches en séquence A-T amplifient deux fois plus le signal de fluorescence que les brins riches en G-C [46]), et un marqueur des mitochondries (Green-fluorescent MitoTracker Green FM, Molecular Probes, Invitrogen) qui se lie de manière covalente aux protéines mitochondriales [47]. Pour cette étude de colocalisation, nous avons utilisé les cellules T24.

Propriétés d'absorption et d'émission des marqueurs

Les spectres d'absorption et d'émission des marqueurs intracellulaires ont été enregistrés dans le DMSO. En effet, le marqueur mitochondrial solubilisé dans le tampon HBSS (milieu de culture minimal) s'adsorbe très fortement sur les parois des cuves en quartz ce qui rend particulièrement difficile l'enregistrement des spectres.

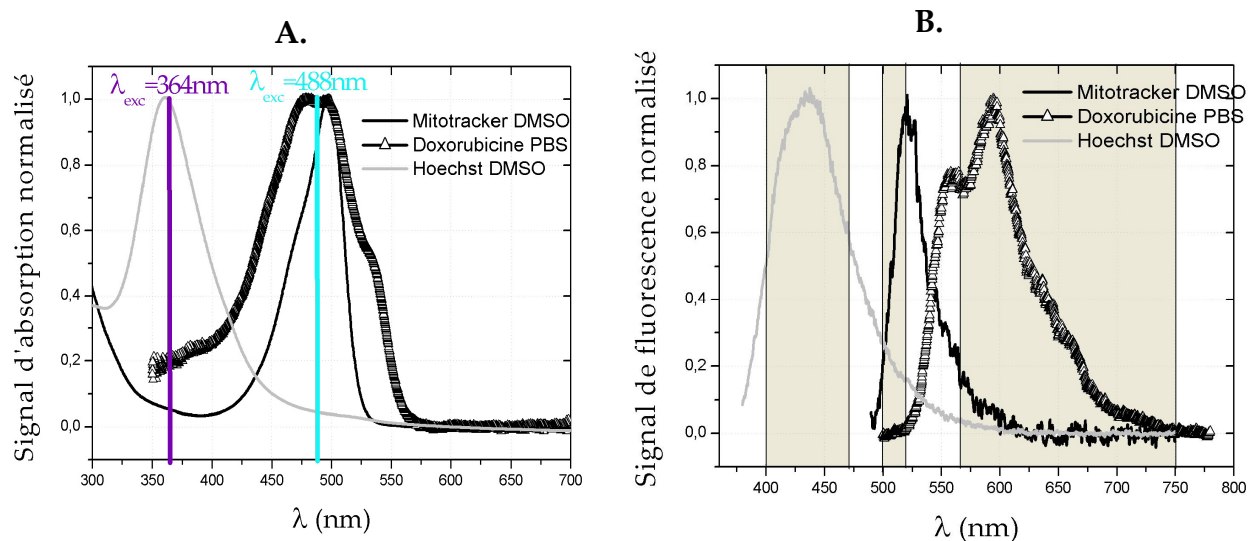


Figure III-10 : A. Spectre d'absorption normalisé du marqueur mitochondrial et du colorant de Hoechst solubilisé dans le DMSO comparé à celui de l'agent doxorubicine dans le PBS, B. Signal de fluorescence normalisé du marqueur mitochondrial et du colorant de Hoechst dans le DMSO ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{exc} = 364 \text{ nm}$), et de l'agent doxorubicine dans le PBS à $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, les zones spectrales étudiées avec le microscope confocal sont repérées pour chacun des composés en gris.

Le marqueur mitochondrial en solution dans le DMSO présente une transition électronique comprise entre 425 nm et 525 nm avec un maximum à 497 nm (Figure III.3-10 A). Quelle que soit la longueur d'excitation, le spectre d'émission de fluorescence est identique présentant un maximum centré à 520 nm (Figure III.3-10 B).

Le colorant de Hoechst absorbe dans le proche UV avec une transition électronique S_0-S_1 centrée à 360 nm (Figure III.3-10 A). Le maximum d'émission de fluorescence est centré à 436 nm (Figure III.3-10 B).

Lors des acquisitions en microscopie de fluorescence confocale, deux raies d'excitation ont été utilisées. Le colorant de Hoechst a été excité avec la raie à 364 nm de laser argon et sa fluorescence a été détectée entre 400 et 470 nm. Les échantillons ont été également soumis au rayonnement de la raie 488 nm. A cette longueur d'onde, le marqueur mitochondrial ainsi que la doxorubicine sont excités, néanmoins les deux molécules possèdent des domaines d'émission de fluorescence relativement bien distinct, on définit donc deux domaines de détection : un domaine de longueur d'onde compris entre 500 et 520 nm pour enregistrer la fluorescence du marqueur mitochondrial et un autre compris entre 560 nm et 750 nm pour la fluorescence de la doxorubicine. Finalement, on a trois domaines de travail (voir zones colorées sur le graphique B de la Figure III.3-10 B.), on peut donc envisager une étude par colocalisation de l'émission de fluorescence des trois molécules les unes par rapport aux autres.

Pour définir les conditions optimales de marquage cellulaire, différentes concentrations ont été testées. Dans le cas du marqueur mitochondrial, il est conseillé d'utiliser une gamme de concentrations comprises entre 20 et 200 nM (fiche technique du fournisseur : <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07510.pdf>) avec un temps d'incubation compris entre 15 et 45 min. Nous avons utilisé le fluorophore à des concentrations de 50, 100, 150 et 200 nM avec un temps d'incubation de 30 min à 37°C. Le meilleur contraste a été obtenu pour une concentration de 100 nM (Figure III.3-11 B, le signal de fluorescence du marqueur mitochondrial est représenté en rouge).

Pour le colorant de Hoechst le fournisseur préconise d'utiliser des doses de fluorophores comprises entre 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec un temps d'incubation compris entre 20 et 30 minutes (fiche technique du fabricant).

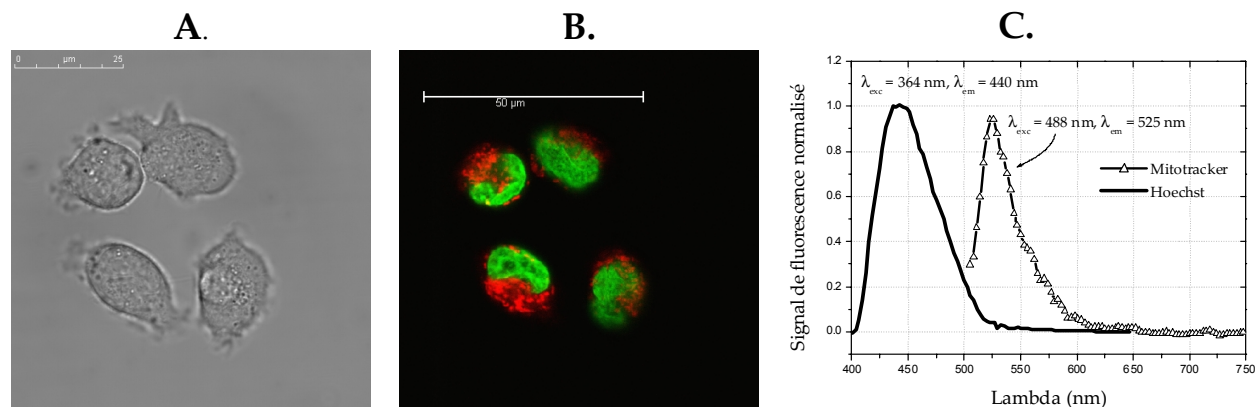


Figure III.3-11 : A. Image en transmission de cellules T24 incubée pendant 30 min dans du milieu contenant du mitotracker à 100 nM et du colorant de Hoechst à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; paramètres de travail : $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, intervalle de détection [505 nm – 750 nm] ; $\lambda_{exc} = 364 \text{ nm}$, intervalle de détection [375 nm - 750 nm] B. Superposition de l'image d'intensité obtenue à $\lambda_{exc} = 364 \text{ nm}$ (fluorescence du Hoechst en vert) et de celle obtenue à $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ (fluorescence du mitotracker en rouge), C. Spectre d'émission de fluorescence normalisé du mitotracker et du Hoechst en milieu cellulaire ; maxima d'émission 440 nm pour le Hoechst et 525 nm pour le mitotracker

Nous avons testé les concentrations 0,2, 0,5, 1, 2, et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec une incubation d'une demie heure à 37°C. Un bon contraste est alors obtenu pour une concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure III.3-11 B signal de fluorescence du marqueur mitochondrial représenté en vert).

D'après la Figure III.3-11 C, les maxima d'émission des deux marqueurs en milieu cellulaire sont décalés vers le rouge par rapport aux maxima de leur spectre d'émission dans le DMSO, soit 525 nm pour le marqueur mitochondrial et 440 nm pour le colorant de Hoechst, au lieu de 520 nm et 436 nm respectivement. Ce déplacement peut s'expliquer soit par des changements de polarité du microenvironnement cellulaire soit par l'apparition d'interactions entre les marqueurs et les biopolymères intracellulaires. Le colorant de Hoechst s'intercale entre les paires de bases des acides nucléiques du noyau. Il est en effet couramment rapporté que l'intercalation de chromophores au sein des paires de bases de l'ADN ou son interaction avec une protéine génère ce type de déplacement spectral.

Le suivi de l'intégration de la doxorubicine au sein des cellules T24 marquées a ensuite été réalisé.

Colocalisation

Après avoir incubé les cellules pendant 30 min avec le marqueur mitochondrial et le colorant de Hoechst, elles sont mises en présence de la doxorubicine à une concentration de 20 μM . Le suivi de la pénétration de la doxorubicine est effectué par microscopie de fluorescence pendant une heure en excitant à 488 nm et à 364 nm.

Comme il a été décrit précédemment pour les autres cellules, la doxorubicine franchit la membrane plasmique des cellules T24 et intègre les entités cytoplasmiques. Au bout d'une heure, la doxorubicine s'accumule dans le noyau : la superposition des images d'intensité de fluorescence (Figure III.3-12) enregistrée sur l'intervalle de détection de l'émission de fluorescence de la doxorubicine [550 - 750 nm] (en rouge sur les images d'intensité de fluorescence) et sur l'intervalle spectral d'émission de fluorescence du colorant de Hoechst [400 - 475 nm] (en bleu sur les images d'intensité de fluorescence) fait apparaître des zones de colocalisation (repérées en fausse couleur rose).

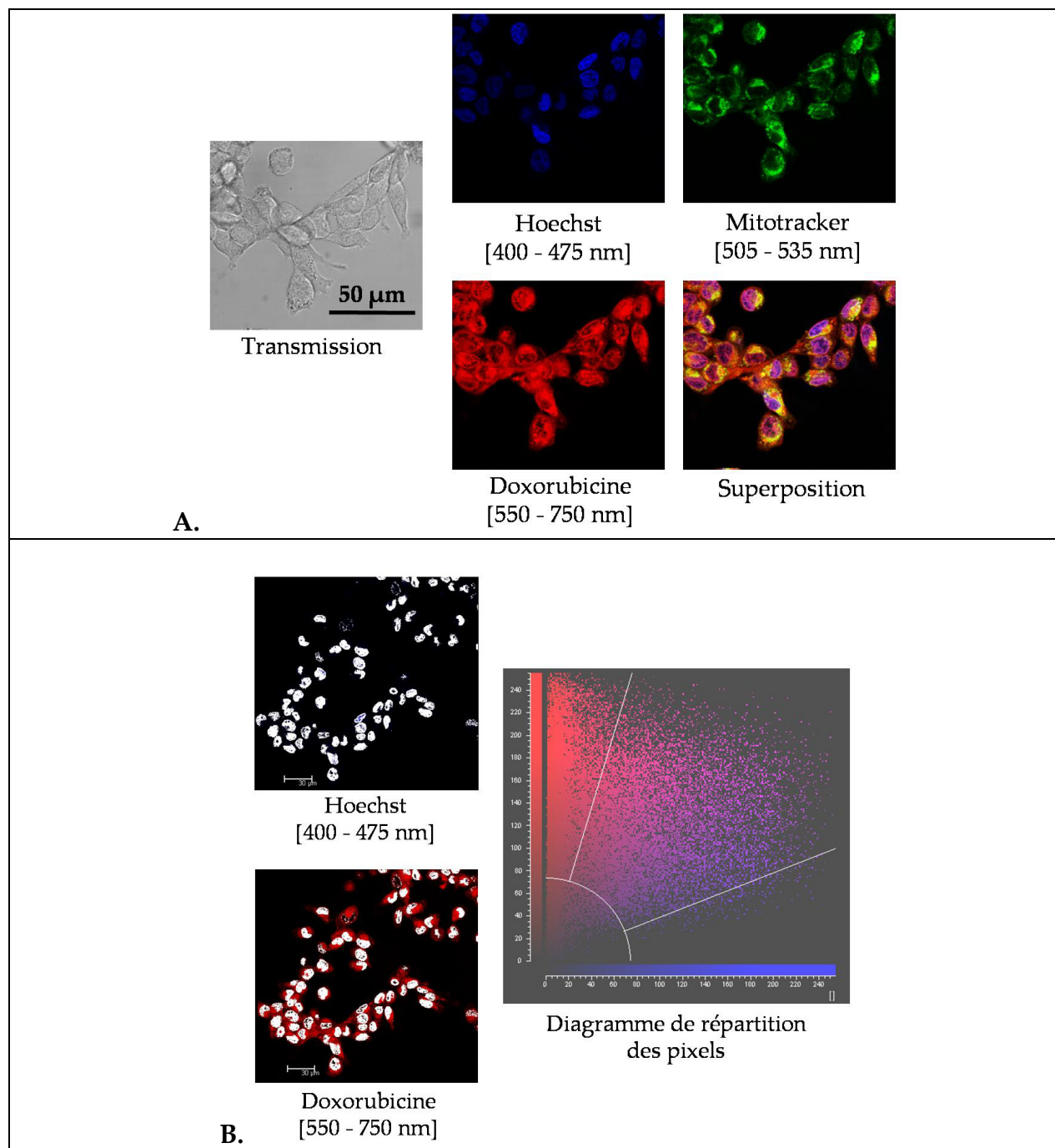


Figure III.3-12 : A. Image en transmission, image d'intensité de fluorescence de la doxorubicine après 1 h d'incubation au sein des cellules T24 marquées avec le colorant de Hoechst et le mitotracker (excitation du colorant de Hoechst à 364 nm et du mitotracker à 488 nm) et image de fluorescence résultant de la superposition des trois images de fluorescence. B. Image d'intensité de fluorescence du colorant de Hoechst, de la doxorubicine et diagramme de colocalisation (ou fluorogramme). Les pixels blancs donnent la colocalisation, le diagramme tient compte du bruit de fond des deux images d'intensité de fluorescence et permet de calculer par la suite le taux de colocalisation entre le colorant de Hoechst et la molécule doxorubicine.

Dans le même esprit, la superposition de l'image d'intensité de fluorescence enregistrée sur l'intervalle spectral [550 – 750 nm] et de l'image d'intensité obtenue sur l'intervalle [505 – 535 nm] permet de vérifier que la molécule doxorubicine intègre effectivement les mitochondries. Les zones de colocalisation apparaissent sur la Figure III.3-12 A. en jaune (fausse couleur).

De plus, les taux de colocalisation existant d'une part entre la doxorubicine et le mitotracker et d'autre part entre la doxorubicine et le colorant de Hoechst ont été calculés expérimentalement.

Remarquons que la représentation choisie pour calculer ce taux de colocalisation est une méthode qui consiste à tracer la valeur d'un pixel de deux images (par exemple l'une en fausse couleur bleue et l'autre en rouge) en fonction l'une de l'autre. Le diagramme de répartition des pixels ainsi obtenu est nommé fluorogramme ou « scatter plot ». Un exemple de fluorogramme est donné pour le colorant de Hoechst et la molécule doxorubicine en Figure III.3-12 B. Dans ce cas, l'intensité d'un pixel donné de l'image en bleue est utilisée comme la coordonnée de l'axe x du fluorogramme et l'intensité du pixel correspondant dans l'image en rouge comme la coordonnée y. Ainsi, une colocalisation complète correspondrait à une distribution des pixels (nuage de points) le long d'une droite dont la pente dépend du rapport des intensités de fluorescence dans les deux canaux. Pour une colocalisation partielle, les pixels se distribuent de part et d'autre de cette droite. Enfin, une différence d'intensité de fluorescence conduira à une déflexion de la distribution des pixels [48].

Finalement, en tenant compte du bruit de fond, on observe une colocalisation partielle du colorant de Hoechst et de la doxorubicine ainsi que de la doxorubicine et du mitotracker avec des intensités de fluorescence différentes. Et à partir des fluorogrammes, on détermine un taux de colocalisation de 36% entre la molécule doxorubicine et le colorant de Hoechst et un taux de 56% entre les mitotracker et la molécule doxorubicine.

On a vérifié dans les zones de colocalisation que le spectre de fluorescence obtenu en excitant à 488 nm présentait trois maxima distincts d'émission : soit deux pics centrés à 560 nm et à 594 nm qui correspondent au maxima d'émission de fluorescence de la doxorubicine et un pic centré à 525 nm associé au maximum d'émission du marqueur mitochondrial (Figure III.3-13).

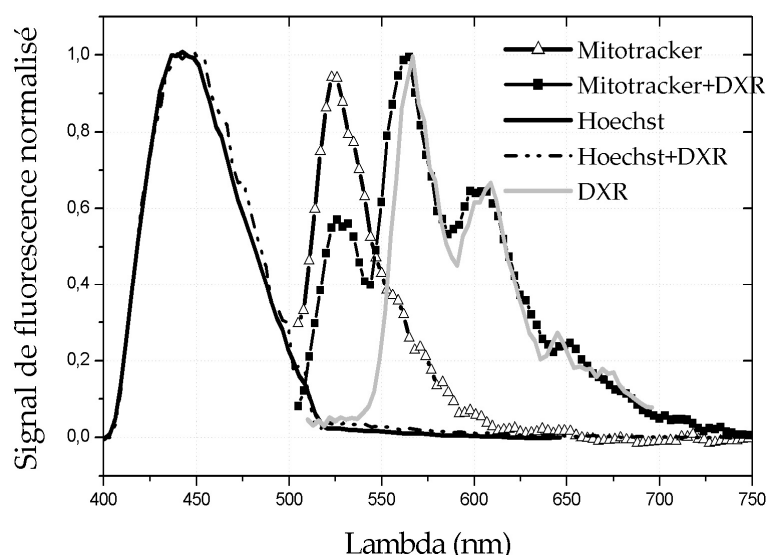


Figure III.3-13: Spectres normalisés d'émission de fluorescence en milieu cellulaire : le spectre de la doxorubicine seule (dans le cytoplasme, trait gris), du mitotracker et du colorant de Hoechst seul ainsi que les deux spectres obtenus avec un comarquage des cellules T24 incubées pendant 1 h avec la doxorubicine à 20 μ M sont superposés ([mitotracker] = 100 nM, [Hoechst] = 1 μ g/mL, λ_{exc} = 361 nm et 488 nm).

On peut également voir sur la Figure III.3-13 que les spectres enregistrés pour une excitation à 364 nm présentent une bande unique correspondant à celle du colorant de Hoechst (le spectre semble démarrer un peu brutalement à 400 nm car le système n'est pas configuré pour détecter la fluorescence en amont de 400 nm).

Ces expériences faites sur les cellules T24 apportent donc des précisions sur la localisation du médicament au sein des lignées cellulaires urothéliales.

Par référence à d'autres travaux, on peut alors envisager que la molécule doxorubicine possède une affinité pour l'ADN mitochondrial en plus des interactions qu'elle peut développer avec les phospholipides de la membrane des mitochondries [45].

Une partie de la doxorubicine présente dans le cytoplasme s'accumule au niveau des mitochondries. La doxorubicine intègre probablement d'autres entités du cytoplasme (comme l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE)) mais les données de la littérature ne font pas état précisément des autres entités dans lesquelles le médicament pourrait s'accumuler et cette étude n'a pas été menée dans le cadre de ce travail.

III.3.3.4. Imagerie résolue spectralement et temporellement

Nous avons vu dans le paragraphe III.3.3.2 qu'il y avait des différences pour le signal de fluorescence de la doxorubicine dès lors que l'on ajoute les autres agents antitumoraux. Elles se situent au niveau de la cinétique d'intégration du médicament. Il y a également des différences observées d'une lignée cellulaire à l'autre. Les variations de l'intensité du signal de fluorescence ne sont d'ailleurs pas élucidées. Peut-on apporter une interprétation aux effets observés lors du suivi de l'intégration de la doxorubicine, au sein des quatre lignées cellulaires, lors de l'ajout des trois autres agents antitumoraux par microscopie de fluorescence résolue spectralement ou temporellement ?

En effet, l'imagerie de fluorescence résolue spectralement et temporellement doit pouvoir nous renseigner sur les interactions développées par la doxorubicine avec son environnement.

III.3.3.4.1. Imagerie spectrale

Doxorubicine seule

Ces spectres ont été acquis dans les mêmes conditions d'excitation et de collection du signal de fluorescence pour chaque lignée cellulaire : c'est à dire en excitant à 488 nm avec une puissance en sortie du laser de 6 mW (dans le plan focal arrière de l'objectif).

Les résultats sont présentés sur la Figure III.3-14 : les cellules ont été incubées pendant deux heures avec 20 μM de doxorubicine et les spectres ont été moyennés sur deux séries de dix cellules, soustraits du bruit de fond et normalisés.

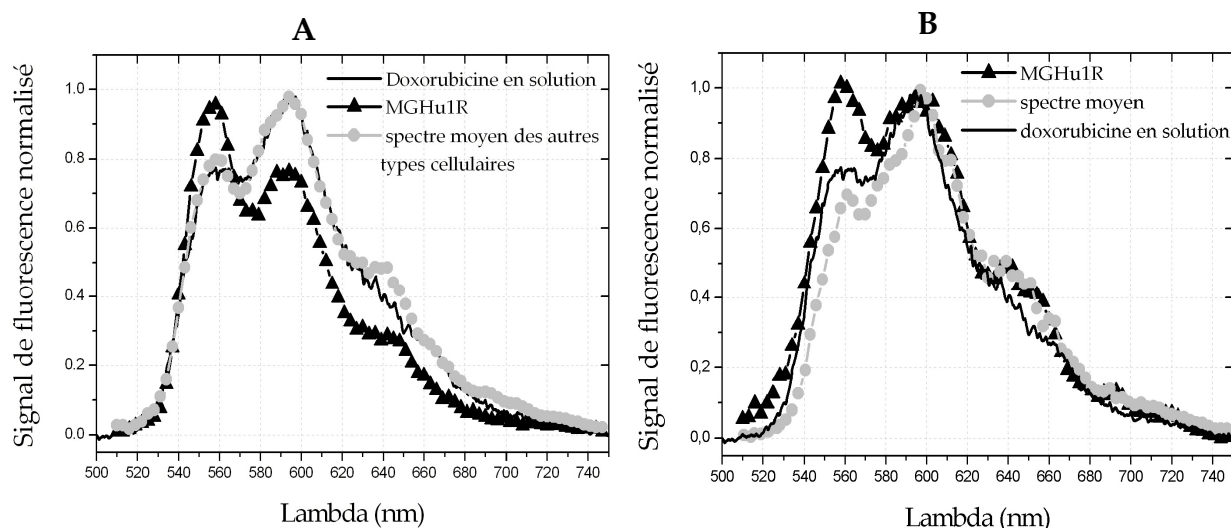


Figure III.3-14 : Spectre d'émission de fluorescence entre 510 nm et 750 nm pour chaque type cellulaire, incubé pendant 4 h avec 20 μM de doxorubicine comparé au spectre d'émission de fluorescence de la doxorubicine en solution: **A.** dans le cytoplasme ; **B.** dans le noyau

Au sein du **noyau**, la doxorubicine dans les trois lignées cellulaires HUC1, HUCT2 et MGHu1S ont un spectre identique à celui de la molécule en solution. Ils sont représentés par un spectre moyen sur la Figure III.3-14 B. Pour les cellules résistantes, on observe un affaissement de l'épaulement à 640 nm. Dans le **cytoplasme**, seul le spectre des cellules résistantes se démarque des autres.

En effet, ses maxima sont centrés aux mêmes longueurs d'onde que ceux enregistrés pour la concentration en solution et les autres cellules mais les intensités relatives des pics à 595 et 560 nm sont inversées.

Les différences majeures constatées proviennent donc du spectre d'émission de fluorescence enregistré dans le cytoplasme des cellules résistantes.

Doxorubicine combinée avec les autres agents antitumoraux composants le MVAC

Les différents spectres d'émission obtenus pour les quatre types de cellules sont représentés sur la Figure III.3-15 . Deux grandes tendances se dégagent de l'ensemble des données enregistrées.

Que l'on soit dans le noyau, dans le cytoplasme ou au niveau des membranes, les spectres acquis pour les cellules HUC1, HUCT2 et MGHu1S sont identiques à celui du MVAC en solution. Les maxima sont centrés à 560 nm, 595 nm et 640 nm. Les petits déplacements spectraux qui pourraient être observés sont dus à l'incertitude de la mesure (Figure III.3-15).

Comme dans le cas de la doxorubicine seule en milieu cellulaire, ce sont les cellules résistantes qui se démarquent des autres lignées. La tendance est plus marquée que pour la doxorubicine seule car les spectres enregistrés sont différents dans le noyau, le cytoplasme et les membranes de celui du mélange MVAC. La position des maxima est inchangée mais le rapport des bandes à 560 nm et à 595 nm est inversé.

L'interaction de la doxorubicine au sein du MVAC avec les composants du milieu cellulaire se caractérise donc par un spectre d'émission de fluorescence spécifique. Ce résultat est reproductible sur un grand nombre de cellules et permet d'envisager d'utiliser cette signature spectroscopique pour discriminer les cellules présentant une MDR des autres.

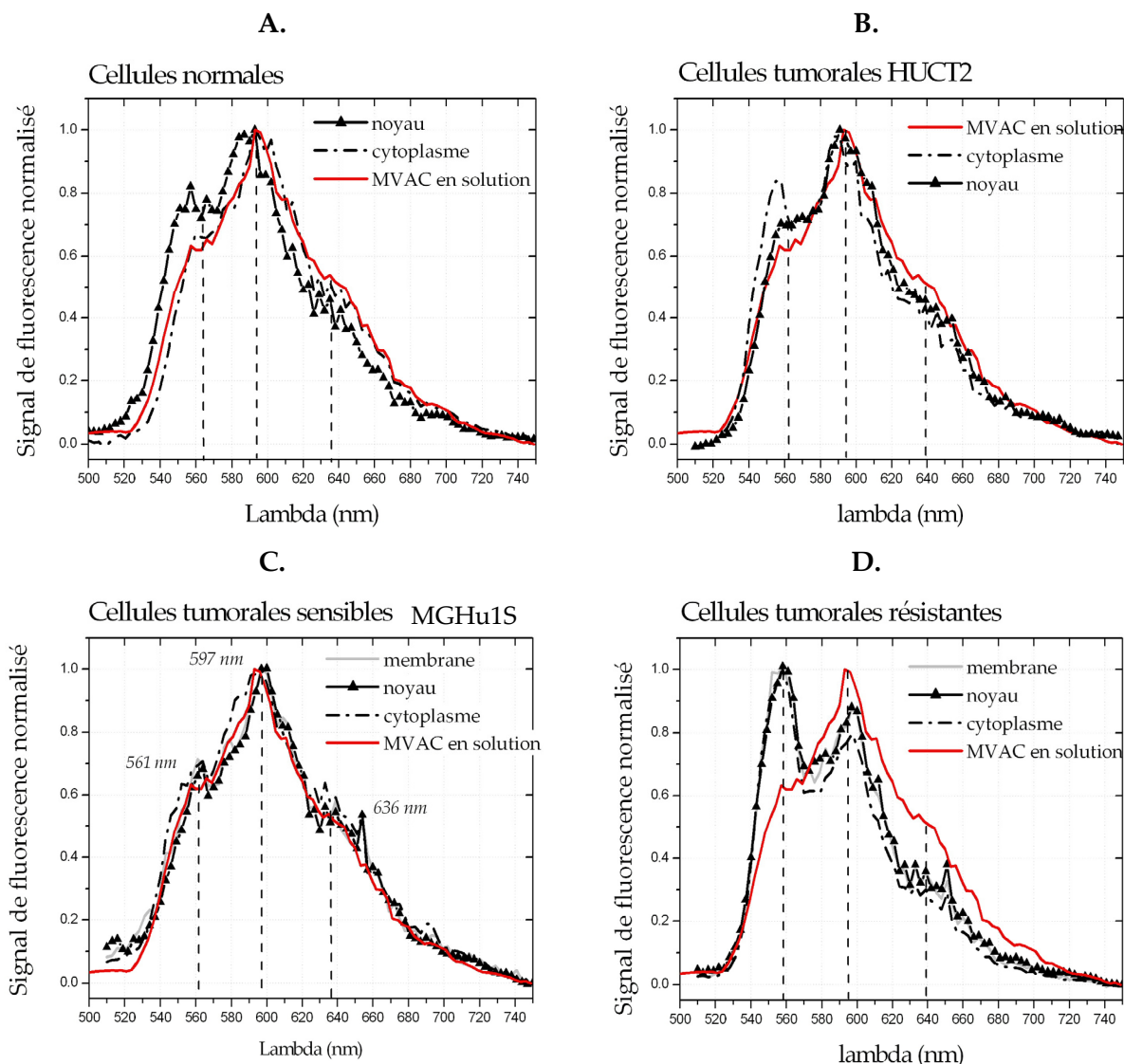


Figure III.3-15 : Spectres d'émission de fluorescence du MVAC en milieu cellulaire à la dose 2 après 4 h d'incubation. Ces spectres sont moyennés, normalisés et comparés au spectre d'émission de fluorescence du mélange MVAC en solution. Pour chaque type cellulaire, le spectre d'émission dans le noyau, dans les membranes plasmiques et en périphérie du noyau ont été enregistrés : A. Cellules normales HUC1, B. Cellules tumorales HUCT2, C. Cellules tumorales sensibles MGHu1S, D. Cellules tumorales résistantes MGHu1R

Il était intéressant de poursuivre ce travail par une étude de la fluorescence résolue temporellement pour compléter les informations obtenues par imagerie de fluorescence d'intensité résolue spectralement. Comme les résultats obtenus jusqu'ici pour les cellules sensibles, HUC1 et HUCT2 sont comparables, l'étude de la fluorescence dynamique n'a été réalisée en ne considérant que les cellules des lignées MGHu1 sensibles et résistantes.

III.3.3.4.2. Imagerie de durée de vie

Le microscope confocal couplé au laser IR titane : saphir femtoseconde (Annexe C 4) a été utilisé pour réaliser les acquisitions en durées de vie. Les cellules ont été incubées pendant deux heures avec la doxorubicine à 20 μM ou le MVAC à la dose 2. L'échantillon a été soumis à une excitation à deux photons à 800 nm pendant 10 à 11 ms, par position soit un temps total de 180 s d'acquisition (pour une image de 128 x 128 pixels soit 246 μm x 246 μm) avec une puissance d'environ 5 mW sur l'échantillon.

Le logiciel utilisé pour cette étude permet d'avoir la carte de répartition des durées de vie en ajustant le déclin obtenu en chaque point par une monoexponentielle et d'établir un diagramme de répartition des durées de vie (sur toute l'image).

Les durées de vie moyennes de fluorescence ont été déterminées pour deux zones d'accumulation de la doxorubicine, c'est à dire en périphérie et au sein du noyau (les Figure III.3-16 A. et B. permettent de distinguer ces deux zones sur les images d'intensité et de durée de vie de fluorescence acquises avec les cellules sensibles).

La durée de vie de fluorescence de la doxorubicine dans le noyau des cellules résistantes a été difficile à déterminer du fait de la très faible intensité du signal émis (trop grande incertitude sur la mesure, trop peu de photons ; dans ce cas on est obligé de combiner les pixels voisins pour avoir un signal suffisant ce qui peut légèrement fausser les valeurs des durées de vie).

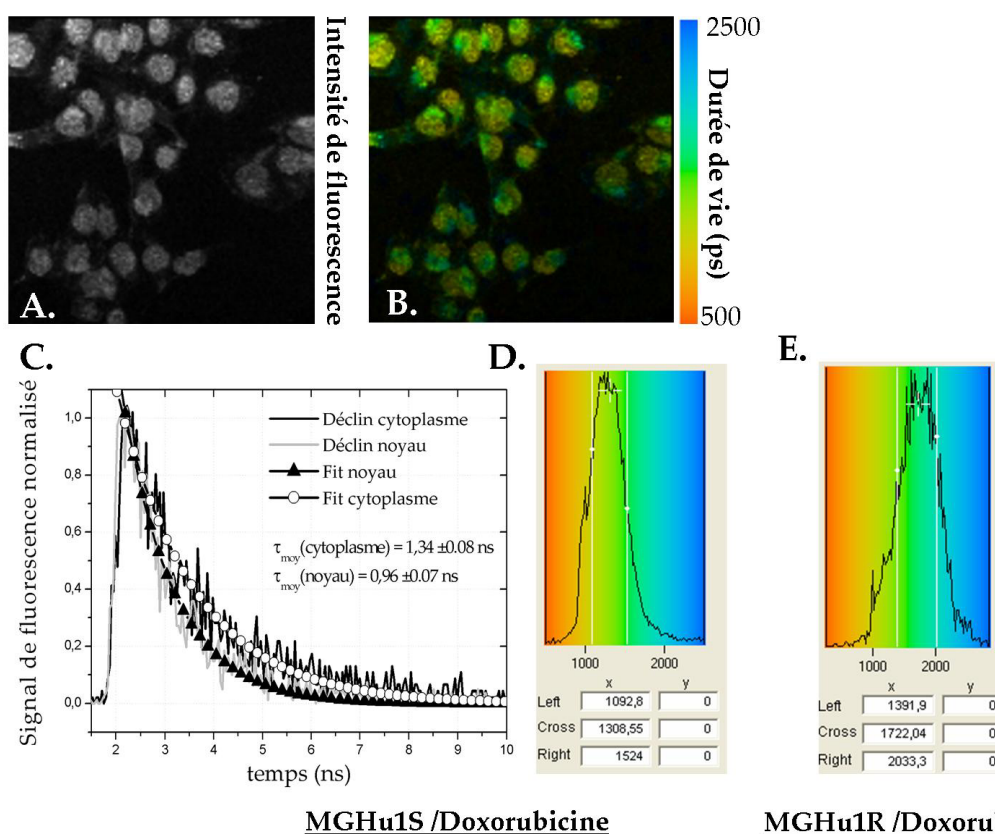


Figure III.3-16: **A.** Image d'intensité de fluorescence des cellules sensibles, incubées pendant 2 h avec de la doxorubicine à 20 μ M ($\lambda_{exc} = 800$ nm, dimension de l'image 246 x 246 μ m, 180 s d'acquisition) ; **B.** Carte de répartition des durées de vie en fausses couleurs avec un ajustement monoexponentiel pour les cellules MGHu1S, **C.** Déclins de fluorescence de MGHu1S enregistrés dans le noyau et dans le cytoplasme avec les ajustements monoexponentiel ; **D.** Diagramme de répartition des durées de vie pour la lignée MGHu1S (échelle de 500 ps à 2500 ps) ; **E.** Diagramme de répartition des durées de vie pour les cellules MGHu1R. (Paramètres d'acquisition, $\lambda_{exc} = 800$ nm, $P \sim 5$ mW sur l'échantillon)

Ces mesures ont permis d'identifier deux durées de vie moyenne de la doxorubicine incubée dans les cellules sensibles : une durée de vie plus courte dans le noyau de 1.0 ± 0.1 ns (Figure III.3-16 C, moyenne réalisée sur deux échantillons d'une dizaine de cellules) identique à la durée de vie de la doxorubicine en solution et une durée de vie plus longue de 1.3 ± 0.1 ns dans le cytoplasme en périphérie du noyau.

Le même type d'acquisition a été effectué avec le MVAC. On retrouve également dans les cellules sensibles deux durées de vie : dans le noyau à 1.0 ± 0.1 ns et dans le cytoplasme à 1.3 ± 0.1 ns (Figure III.3-17). Ces valeurs sont identiques à celles obtenues pour la doxorubicine seule. La présence des autres agents antitumoraux n'influence donc pas la durée de vie de fluorescence de la doxorubicine, ce qui était également le cas en solution.

En ce qui concerne la durée de vie de fluorescence mesurée dans le cytoplasme, l'allongement de la valeur de cette durée de vie confirme une interaction entre la doxorubicine et l'environnement cytoplasmique. Nous avons vu précédemment (paragraphe III.3.3.2) que la doxorubicine se complexe aux dérivés flaviniques [41] : ces interactions peuvent-elles expliquer la variation de durée de vie observée au niveau du cytoplasme ?

Dans le cas des cellules résistantes incubées avec la doxorubicine seule, la durée de vie moyenne dans le cytoplasme est de $1,6 \pm 0,2$ ns, valeur comparable à celle mesurée dans les cellules sensibles compte tenu que l'intensité de fluorescence provenant des cellules résistantes est faible et la précision des mesures moins bonnes que pour les cellules sensibles.

La Figure III.3-17 présente les images d'intensité et de durée de vie de fluorescence enregistrées avec les cellules résistantes incubées avec le mélange MVAC. On obtient la même durée de vie de fluorescence cytoplasmique (1.4 ± 0.2 ns) que lorsque les cellules sont incubées avec la doxorubicine seule. Cette valeur est également identique à celle mesurée pour les cellules sensibles.

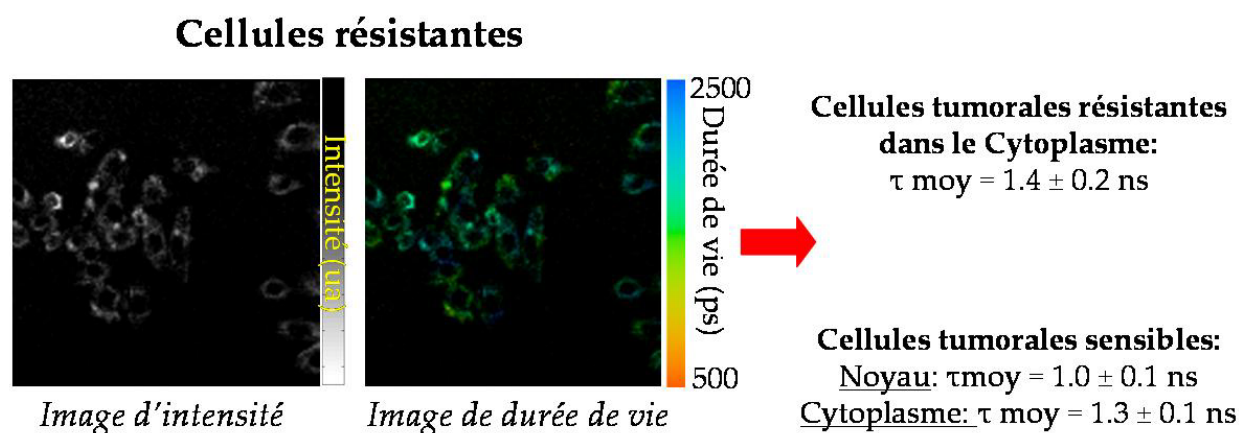


Figure III.3-17 : Image d'intensité de fluorescence des cellules résistantes incubées pendant deux heures avec le mélange MVAC à la dose2, $\lambda_{\text{exc}} = 800$ nm, dimension de l'image 128×128 , 120 s d'acquisition ; Durée de vie moyenne obtenue pour les cellules sensibles et les cellules résistantes.

III.3.3.5. Bilan

Les résultats obtenus avec le mélange thérapeutique MVAC sont similaires à ceux obtenus avec la doxorubicine seule du point de vue de la localisation, des spectres d'émission de fluorescence et des durées de vie de fluorescence. Les différences observées sont relatives à la cinétique de pénétration de la doxorubicine au sein des différentes lignées cellulaires. On a également mis en évidence que la présence des trois autres agents antitumoraux a une influence sur la pénétration de la doxorubicine dans les cellules HUCT2 et MGHu1S et sur leur l'intensité totale de fluorescence.

La lignée résistante contraste bien avec les autres lignées et peut être aisément discriminée des autres cellules. En effet, le signal d'intensité de fluorescence dans le noyau des cellules résistantes est 6 à 10 fois plus faible que celui du noyau des cellules sensibles. Il est donc tout à fait possible de prendre en compte l'intensité de fluorescence résolue spectralement de l'agent doxorubicine comme facteur de contraste pour détecter les cellules comportant une résistance médicamenteuse de type MDR.

III.3.4. ...Vers un protocole expérimental pour établir un test prédictif de MDR

Sur la base de ces résultats, pour détecter une résistance de type MDR chez un patient atteint d'une tumeur urothéliale, il va être impératif de mettre au point un protocole expérimental à partir des urines du patient. En effet, un prélèvement cellulaire pour une primo culture ne pourra pas être envisagé car celle-ci est trop complexe à mettre en œuvre et est coûteuse.

L'échantillon d'urine doit être incubé pendant deux heures avec le mélange d'agents antitumoraux MVAC à la dose 2 puis les cellules contenues dans ces urines sont isolées sur lame pour être enfin observées par microscopie de fluorescence. On peut également enregistrer des spectres d'émission de fluorescence pour appuyer les résultats puisque les cellules résistantes présentent un spectre d'émission de fluorescence différent des autres lignées cellulaires.

En amont de ces mesures sur des prélèvements urinaires, nous avons mis au point un protocole avec les lignées urothéliales. En effet, les échantillons envisagés pour le test sont composés de cellules fixées dont les propriétés spectroscopiques peuvent être modifiées par rapport à celles des cellules vivantes. Une première étape a donc consisté à vérifier le comportement des lignées cellulaires incubées avec le médicament une fois fixées par rapport aux résultats obtenus avec les lignées cellulaires vivantes.

A partir des cellules en culture, nous avons deux protocoles possibles pour fixer les cellules. Soit les cellules sont incubées avec le médicament puis décollées (par trypsinisation), projetées sur lame avant d'être fixées puis montées entre lame et lamelle. Une autre possibilité consiste à mettre en culture les cellules directement dans des chambres de culture à puit amovible qui serviront ensuite pour l'observation sur le microscope confocal (préparation des échantillons détaillée en Annexe C 6 p.150).

La principale différence entre les deux types de protocole réside dans la suppression de l'étape permettant de décoller les cellules. Dans cette étape, une enzyme, la trypsine, associée à un chélatant du calcium l'EDTA est utilisée et fragilise la membrane des cellules. On peut alors supposer que cette étape qui a lieu après l'incubation des cellules avec le médicament peut modifier la localisation du médicament au sein des cellules. Nous avons effectivement vérifié sur des échantillons tests (les quatre lignées cellulaires prises séparément ou mélangées) qu'avec cette méthode de préparation l'intensité de fluorescence dans les cellules tumorales sensibles à l'agent doxorubicine était largement diminuée et que les résultats n'étaient pas reproductibles.

L'étude a donc été faite en utilisant la deuxième méthode de fixation des échantillons. L'opération de fixation de l'échantillon se fait directement dans le puit amovible. Les images d'intensité de fluorescence obtenues avec les quatre lignées cellulaires HUC1, HUCT2, MGHu1R et S sont données en Figure III.3-18.

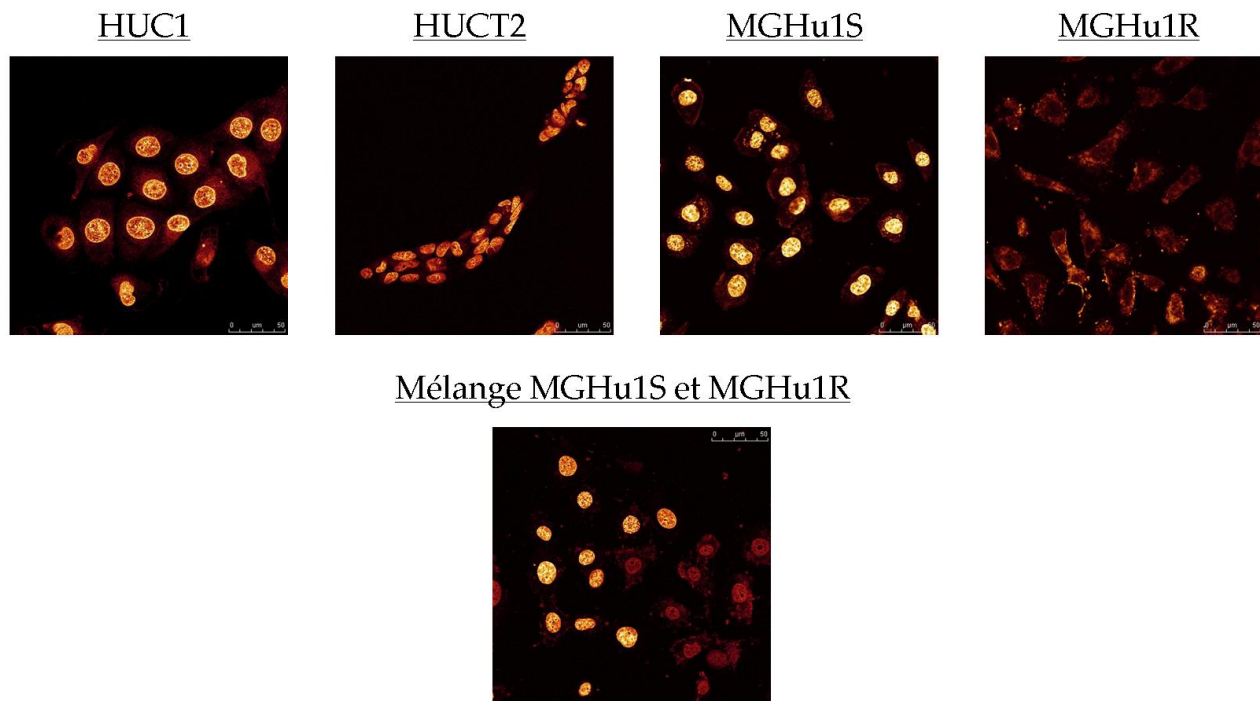


Figure III.3-18 : Image d'intensité de fluorescence des cellules immobilisées sur lame pour les quatre lignées : les lignées HUC1, HUCT2, MGHu1R, MGHu1S et le mélange (incubation de 2 h avec le MVAC à la dose2)

De façon générale, si on compare les résultats obtenus sur les cellules fixées avec ceux obtenus sur les cellules adhérentes vivantes, le contraste entre le signal de fluorescence du noyau et celui du cytoplasme est plus marqué et le signal de fluorescence détecté au sein du noyau des cellules résistantes est plus intense que lorsque les cellules sont vivantes. Il est donc plus approprié de comparer les types cellulaires entre eux en calculant le rapport intensité du noyau sur intensité du cytoplasme.

La localisation de la fluorescence de la doxorubicine dans les cellules HUC1 et HUCT2 est identique : le signal de fluorescence dans le noyau est 5 à 7 fois plus important que celui détecté dans le cytoplasme. De même pour les cellules sensibles MGHu1S, le rapport intensité du noyau sur intensité du cytoplasme est

égal à 10. Ce rapport est inférieur pour les cellules résistantes : $\frac{I_{\text{noyau}}}{I_{\text{cytoplasme}}} = 2$. Ce rapport d'intensité sera

utilisé comme contraste pour discriminer les cellules résistantes des autres types cellulaires.

L'image d'intensité de fluorescence enregistrée sur un échantillon contenant 50% de cellules résistantes et 50% de cellules sensibles (Figure III.3-18) montre que l'on garde un bon contraste entre les deux types de cellules. Il est donc aisé de discriminer les cellules résistantes des cellules sensibles et par extension des autres types cellulaires, en comparant les images d'intensité de fluorescence obtenues pour chaque lignée cellulaire isolée sur lame prise séparément

III.4. Perspectives : Premier test clinique

Un premier essai clinique a été effectué sur des urines provenant d'un patient atteint d'un cancer (tumeur superficielle de haut grade pTaG3). Les urines sont aussitôt traitées après le prélèvement effectué au cours d'une résection, nous avons donc à notre disposition une grande quantité de matériel biologique. Le protocole de préparation des échantillons est détaillé en Annexe C 7, p. 151. La suspension cellulaire est mise directement en présence du MVAC pendant deux heures puis projetée par cyto-centrifugation sur lame, fixée et montée. L'observation des lames a été faite avec le microscope confocal en excitant l'échantillon avec la raie laser 488 nm.

L'observation de notre échantillon s'est avérée un peu délicate du fait de la présence d'un grand nombre d'hématies. Cependant, on peut constater que le médicament pénètre effectivement au sein des cellules et qu'il existe une zone présentant une intensité de fluorescence plus importante, correspondant au noyau. Aux vues des résultats obtenus, il apparaît que l'échantillon est composé de cellules sensibles au traitement. En effet, si on s'intéresse à un amas de cellules qui pourrait correspondre à un amas tumoral, on observe un fort contraste entre intensité de fluorescence du cytoplasme et du noyau ce qui est généralement caractéristique des cellules tumorales sensibles à la thérapie. Le rapport d'intensité $I_{\text{noyau}}/I_{\text{cyto}}$ est compris entre 5 et 6 et est donc supérieur à 2 qui est le facteur caractéristique des cellules résistantes dans nos essais sur les lignées cellulaires.

L'acquisition d'un spectre de fluorescence, moyenné sur 10 amas de cellules, permet de confirmer qu'il s'agit bien du spectre d'émission de la doxorubicine caractéristique de celui mesuré au sein des cellules tumorales sensibles comme cela a été présenté au paragraphe III.3.3.4.1 (Figure III.4-1 G). Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle, la lame étudiée comporte des cellules tumorales sensibles à l'agent antitumoral doxorubicine.

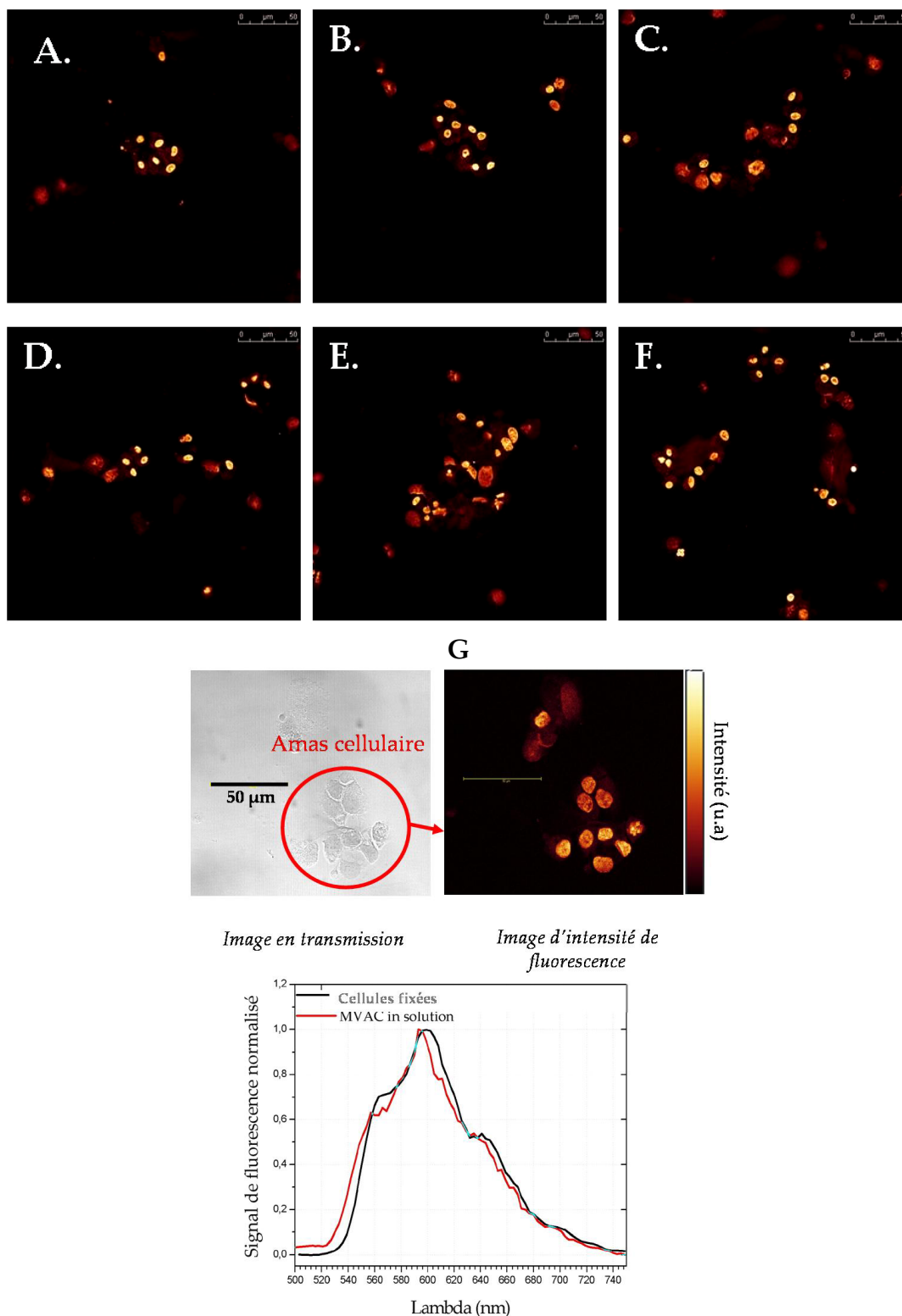


Figure III.4-1 : A-F : Images d'intensité de fluorescence de différentes zones caractéristiques de l'échantillon, G. Image en transmission et en intensité d'un amas cellulaire avec le spectre d'émission de fluorescence moyenné sur un grand nombre d'échantillons (normalisé et comparé au spectre de la doxorubicine seule en solution).

Ces premiers résultats sont prometteurs de part la convivialité du test et la facilité de mise en place des échantillons. De plus, les lames préparées pourront être facilement observables à l'aide d'un microscope en épifluorescence dont l'utilisation est très répandue. Cette étude est actuellement poursuivie par des tests plus approfondis en milieu hospitalier.

Annexe C : Matériels et Méthodes

Annexe C 1. Classification des tumeurs urothéliales

Pour le grade de la tumeur détectée, il existe trois niveaux de classification G1 G2 G3 et on définit le grade et stade de la lésion selon la classification suivante : TNM-UICC 2002

1. T (Tumeur)

Tx Tumeur primitive ne pouvant être classée

T0 Tumeur ne pouvant être classée

Ta carcinome papillaire superficiel (respectant la membrane basale)

Tis carcinome in situ (plan, respectant la membrane basale)

T1 Tumeur envahissant le tissu conjonctif sous-épithélial

T2 Tumeur envahissant le muscle

T2a Musculeuse superficielle

T2b Musculeuse profonde

T3 Tumeur envahissant le tissu péri vésical (graisse)

T3a Atteinte microscopique

T3b Atteinte macroscopique

T4 Invasion des viscères adjacentes

T4a Prostate ou utérus ou vagin

T4b Paroi pelvienne ou paroi abdominale

2. N (Adénopathies régionales)

Nx Absence de renseignements suffisants

N1 Envahissement d'un seul ganglion pelvien < 2 cm de plus grand diamètre

N2 Envahissement d'un seul ganglion > 2 cm mais < 5 cm ou plusieurs ganglions < 5 cm

N3 Envahissement d'un ganglion > 5 cm

3. M (Métastases à distance)

M0 Pas de métastase à distance

M1 Présence de métastases à distance

Risques et évolution associés à ces différents grades et stades

Le comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie a défini une classification des tumeurs superficielle de la vessie [49]. Cette classification permet de distinguer trois stades pour lesquels le risque de rechute à 5 ans et de décès à 10 ans se distingue nettement.

RISQUE EVOLUTIF	CANCER SUPERFICIEL DE LA VESSIE	RISQUE DE PROGRESSION A 5 ANS	RISQUE DE DECES PAR TUMEUR A 10 ANS
Groupe 1 : risque faible	pTa G1 unique pTa G1-G2 non récidivant à trois mois	7.1%	4.3%
Groupe 2: risque intermédiaire	pTa G2 multifocal pTa multirécidivant pTa G3, pT1 G2 unique	17.4%	12.8%
Groupe 3 : risque élevé	pT1 G3 pTis diffus pT1 multifocal pT1 récidivant à moins de 6 mois	41.6%	36.1%

Ref : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Cancer_de_la_vessie](http://fr.wikipedia.org/wiki/Cancer_de_la vessie)

Les lignées cellulaires tumorales qui seront utilisées pour notre étude appartiennent au groupe pTa.

Annexe C 2. Culture cellulaire

Les lignées SV-HUC-1, MC-SV-HUCT-2 et T24 viennent de la banque cellulaire américaine ATCC (The American Type Culture Collection, ATCC number : CRL-9519 (HUCT2), CRL-9520 (HUC1), HTB-4 (T24)).

Les cellules T24 sont cultivées dans des flacons de culture de 75 cm² (ou 25 cm²) contenant du milieu McCoy's 5A (15 ou 5 mL selon le type de flasque utilisé) avec Glutamax (forme stabilisée de Glutamine à 2mM en concentration finale) enrichi avec 10% de sérum de veau foetal et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Elles sont placées dans un incubateur à 5% de CO₂ (dans l'air) et à 37°C à saturation en humidité et se multiplient jusqu'à former un tapis cellulaire monocouche jointif, on parle alors de confluence. A ce stade, on procède à un passage : les cellules sont décollées pour être réensemencées dans un nouveau flacon de culture. Pour cela, le surnageant contenant le milieu de culture appauvri et les cellules mortes est retiré puis un rinçage doux au PBS est effectué afin d'éliminer toutes traces de milieu et de sérum. En effet, le sérum contenu dans le milieu inactiverait l'enzyme, la trypsine, utilisée pour décoller les cellules. On place dans l'incubateur à 37°C, 5% de CO₂, le flacon de culture dans lequel on aura ajouté au préalable 3 mL (ou 1mL pour un flacon de 25 cm²) de trypsine. Après environ 3 min, les cellules se décollent et sont récupérées en complétant avec du milieu frais pour obtenir un volume final de 10 mL (l'activité de l'enzyme est bloquée par l'ajout de milieu de culture contenant du sérum de veau). La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée (5 min, 1200 tr/min) et seul le culot sera récupéré. Celui-ci est remis en suspension et c'est à partir de cette suspension cellulaire que les dilutions seront effectuées pour ensemercer les flacons de culture ou chambres de culture cellulaire multi compartimentées adaptables sur un microscope confocal inversé (boîtes Lab-Teks II de la société Nunc). Dans le cas de la lignée T24, une dilution au 1 :10 sera effectuée pour la sous culture.

Pour les lignées HUCT2 et HUC1 seront utilisés respectivement les milieux de culture Ham's F12 (dulbecco, glutamax) et F12K (Kaighn's modification of Ham's F12 medium, dulbecco, glutamax). Le protocole est identique avec une dilution pour la sous culture de 1 :2 à 1 :5.

Les lignées MGH-u1R et MGH-u1S ont été fournies par le docteur Dr Bashir A. Lwaleed du département d'urologie de l'hôpital général de Southampton «Southampton University Hospitals NHS Trust» au Royaume-Uni. Le mode de décongélation est identique aux autres lignées ainsi que la mise en culture. Les cellules évoluent en monocouche adhérente dans du Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, invitrogen) complété avec 10% de sérum de veau foetal, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. L'incubateur est à 37 °C avec 5% de CO₂ et 100% d'humidité. La dilution pour la sous culture est de 1:10.

Le protocole d'obtention de la lignée résistante MGH-u1R est décrit dans la référence suivante [50]

Brièvement, une lignée cellulaire humaine de tumeur de vessie MGH-u1 a été exposée à des concentrations croissantes de doxorubicine sur une période de 12 mois. La lignée résistante, MGH-u1R, est 9 fois plus résistante à la doxorubicine et 30 fois plus à la daunorubicine que la lignée parente. Les phénotypes de la lignée résistante et de la lignée MGH-u1 sont identiques.

Etude par microscopie de fluorescence

Les cellules sont ensemencées, pour leur observation au microscope confocal, dans des chambres de culture cellulaire multi compartimentées (2 ou 4 puits) sur lamelle de verre adaptables sur un microscope confocal inversé (boîtes chamber coverglass Lab-Teks II de la société Nunc). Il est à noter que pour toute série d'expérience un des puits est conservé comme puit témoin (absence de médicament). On vérifie ainsi que l'autofluorescence de nos cellules est négligeable comparativement à celle des médicaments.

Après incubation avec le médicament, le surnageant contenant le médicament est enlevé, on rince les puits avec un tampon phosphate salin (PBS) et on renouvelle avec du milieu de culture frais. Celui-ci contient du rouge de phénol, utilisé comme indicateur coloré témoin de l'oxydation du milieu qui absorbe dans le bleu mais ne perturbe en rien les mesures de fluorescence (vérification faites avec les puits témoin).

Annexe C 3. Mise en solution des agents thérapeutiques

La molécule doxorubicine (sigma aldrich, doxorubicin hydrochloride, fluka BioChemika, for fluorescence, MM= 579.98 g/mol) est soluble dans l'eau. Pour solubiliser le produit, on ajoute directement 1mL d'eau déionisée stérile. Inconvénients majeurs : la solution obtenue est particulièrement visqueuse et non homogène. De plus, la molécule s'adsorbe très facilement sur les parois du tube. Il faut donc agiter la solution stock régulièrement et attendre un jour avant de l'utiliser pour avoir une solubilisation complète du produit. Connaissant le coefficient d'extinction molaire de la molécule dans le PBS à 480nm, nous avons vérifié au spectrophotomètre la concentration finale de la solution stock : soit 0.0142 mol.L⁻¹.

La molécule vinblastine (vinblastin sulfate salt, sigma, MM= 909.05 g/mol) est également soluble dans l'eau. Comme la doxorubicine, il suffit d'ajouter 1 mL d'eau déionisée stérile pour obtenir une solution à 10 mg/mL translucide.

La molécule cisplatine (cis-diammineplatinum (II) dichloride, sigma, MM= 300.05 g/mol) est difficilement soluble dans l'eau et peu stable en solution aqueuse. Il est préférable de dissoudre 25 mg du produit dans 1.5 mL de DMF. On obtient alors une solution mère jaune pâle à 16.6 mg/mL (remarque : il faut attendre une nuit pour que le produit se solubilise complètement).

La molécule méthotrexate (sigma, MM= 454.44 g/mol) se dissout dans un milieu basique comme un tampon de carbonate de sodium de pH= 9.5 : on prépare 50 mL de NaHCO₃ à 0.5 M auxquels sont ajoutés 3.2 mL de NaOH à 1 M dans une fiole de 100 mL. On ajuste avec de l'eau déionisée. Pour une solution stock de 5 mM, on pèse 2.5 mg de méthotrexate qui sont dilués dans 1 mL de la solution tampon précédemment préparée. La solution obtenue est jaune vif.

A partir de ces quatre solutions stock de médicament, on prépare des solutions utilisées pour les études en milieu cellulaire renouvelées à chaque nouvelle série de mesures.

Une fois les médicaments mis en solution, les solutions stocks doivent être conservées entre 2-8 °C à l'abri de la lumière et être rapidement utilisées (stabilité entre 4 et 12 mois).

Annexe C 4. Microscope confocal multimodal : le système SP5 Leica

Le dispositif confocal multimodal SP5 (Figure C-1) est basé sur le système SP2 décrit dans l'annexe B 2 et offre la possibilité d'acquérir des images d'intensité résolue spectralement ou temporellement. Le système comporte, en plus des trois sources laser visibles, une source laser UV externe (laser Argon, raie à 351 nm et 364 nm d'une puissance maximale de 50 mW) et est couplé à un laser impulsionnel femtoseconde IR. Pour acquérir les images FLIM, une détection externe a été mise en place utilisant un photomultiplicateur (PMT) interne et un système de comptage de photons unique.

Mesures de temps de vie de fluorescence : Composition du système

Le système d'acquisition des déclins et images de durée de vie de fluorescence implanté sur le microscope confocal SP5 est composé d'une source laser pulsée, d'un détecteur de haute résolution et d'une carte de comptage de photons.

La mesure des durées de vie est réalisée suite à une excitation biphotonique de l'échantillon au moyen d'un laser pulsé titane : saphir (Chameleon-XR (Coherent Inc.) pompé par une diode laser, Verdi, Coherent Inc. à 5 W). Ce laser permet d'obtenir des impulsions d'une largeur temporelle d'environ 140 fs, à une cadence de 90 MHz, soit environ 11 ns entre deux impulsions laser et avec une puissance moyenne en sortie de cavité d'environ 1,5 W. La longueur d'onde de l'impulsion est accordable entre 705 nm et 980 nm, ce qui permet d'exciter les principaux fluorophores utilisés pour marquer les échantillons. A la sortie de la cavité, seule 10% de la puissance laser en sortie est amenée via un périscope à l'entrée de la tête du scanner qui déplace le faisceau sur l'échantillon.

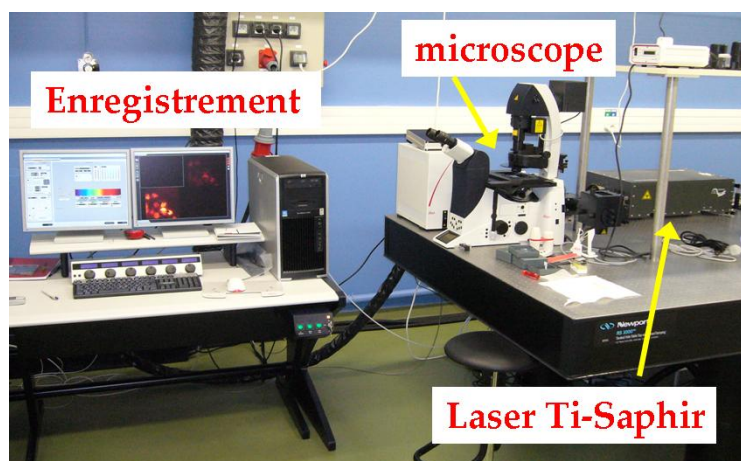


Figure C-1 : Photo du système SP5 couplé avec le laser Ti :saphir IR

Détecteur et carte de comptage de photons

Un photomultiplicateur externe au système (PMC-100, Becker-Hickl, GmbH, temps de réponse de l'appareil, FWHM, compris entre 28 et 36 ps) et placé sur une sortie descannée, est utilisé pour les mesures de durée de vie de fluorescence. Un filtre infrarouge bloquant les longueurs d'onde supérieures à 750 nm est positionné devant le détecteur pour bloquer le faisceau incident résiduel.

Les données fournies par le détecteur sont rendues exploitables par une carte d'acquisition, SPC-830 (Becker et Hickl). Ce système est particulièrement convivial puisqu'il permet de faire l'acquisition en temps réel des durées de vie en un point de l'échantillon comme sur toute l'image. Ce système est composé de la carte d'acquisition et d'un logiciel de visualisation. Il permet de trier très rapidement les photons en fonction du retard entre l'excitation du fluorophore et l'émission du signal de fluorescence puis de donner l'image complète des durées de vie. On a accès aux déclins de fluorescence et aux diagrammes de répartition des durées de vie. Le système de traitement peut ajuster les déclins en chaque point soit par un modèle monoexponentiel soit par un modèle multiexponentiel

Annexe C 5. Stabilité de l'association d'agents antitumoraux MVAC

Le suivi de la stabilité du mélange de médicaments MVAC a été réalisé en enregistrant les spectres d'absorption. Les quatre molécules ont été introduites dans une cuve en quartz à la concentration 0,2 mM dans du milieu de culture type DMEM. On laisse la cuve en contact de l'atmosphère humide de l'incubateur chargée à 5% de CO₂. Le spectre d'absorption est enregistré à intervalles réguliers jusqu'à 24 h.

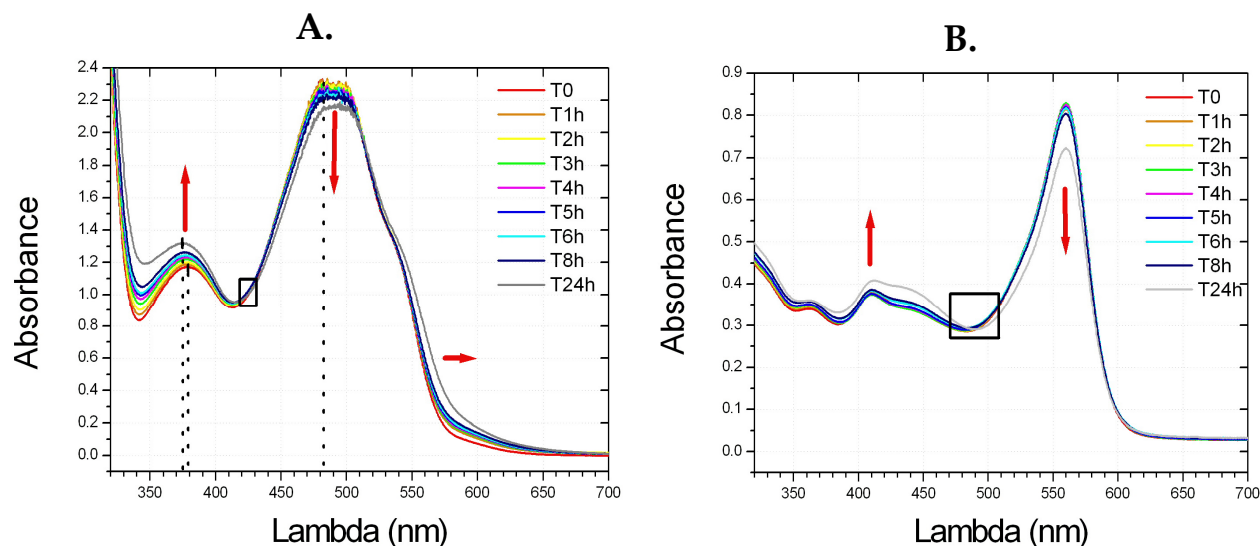


Figure C-2: A. Evolution au cours du temps du spectre d'absorption du MVAC de $t=0$ à $t=24h$, soustrait du spectre d'absorption du milieu de culture B. Evolution du spectre d'absorption brut du milieu au cours du temps.

Le spectre d'absorption du médicament est inchangé jusqu'à 4h (Figure C-2 A.). On observe une évolution spectrale au bout de 8 h, avec apparition de deux points isobestique caractérisant un changement de forme moléculaire (autour de 425 nm après 8h). Finalement au bout de 24 h, le pic à 374 nm passe de 1,17 en absorbance à 1,32 et se décale 4 nm vers le bleu (effet hypsochrome). L'absorbance de la bande centrée à 488 nm diminue de 0,15 en absorbance. On n'observe pas de déplacement du maximum d'absorption mais un élargissement du pied de bande. On peut observer un deuxième point isobestique autour de 512 nm.

Par conséquent, dans la gamme de temps pendant laquelle nous réalisons nos expériences soit entre 2 et 4 heures, les médicaments utilisés sont stables.

Annexe C 6. Préparation des échantillons tests

Dans ce cas on ensemence avec une seule ou plusieurs lignées cellulaires une chambre de culture possédant un seul puit (dans ce cas on peut mettre jusqu'à 4 mL de milieu) dont les parois sont amovibles. Une fois que les cellules ont été incubées avec le médicament, il suffit de rincer deux fois au PBS, d'ajouter environ 1 mL de PFA à 4% pour fixer le système, de rincer à nouveau au PBS, d'enlever les parois du puit et de monter l'échantillon entre lame et lamelle avec du fluoromount (milieu de montage idéal pour les échantillons fluorescents). Il est difficile de contrôler la quantité d'un type cellulaire par rapport à un autre, néanmoins cette méthode à l'avantage de préserver au maximum le matériel biologique. Ainsi il n'est pas nécessaire de décoller les cellules et donc d'utiliser de la trypsine qui peut endommager leurs membranes.

Annexe C 7. Préparation des échantillons hospitaliers

Un seul essai a été réalisé sur un échantillon de cellule provenant d'un patient atteint d'un cancer urothélial. Nous avons essayé de faire adhérer les cellules présentes dans les urines sur des labteks à un puit amovible coaté au PAA, cette méthode ne fonctionne pas. Il vaut mieux récupérer par centrifugation les cellules présentes dans les urines (éventuellement prévoir une hémolyse si les urines contiennent trop de sang), enlever le surnageant et resuspendre les cellules dans du milieu de culture DMEM complet ou peut-être dans un milieu minimum type HBSS (non testé). Selon la quantité de cellules présentes dans les urines prévoir ou non une dilution.

Ex : pour un échantillon contenant environ 30 mL d'urine

Centrifuger à 1000 tr/min à 20°C (faible décélération pour préserver l'intégrité cellulaire) ; après avoir enlevé le surnageant, resuspendre les cellules dans 5 mL de milieu et diluer 250 µL du mélange cellulaire dans 3.75 mL de milieu, laisser incuber 2 à 4 heures avec le MVAC, idéalement avec une dose proche de la dose 2 définie dans le paragraphe III.3.3.1 dans une boîte de pétri. Après incubation, enlever une partie du surnageant (environ 2 mL, les cellules s'étant déposées au fond), ré-homogénéiser et projeter tel quel sans rincer (800 tr/min pendant 10 min) ; fixer puis monter.

Références

1. Moreau, A., K. Renaudin, and F. Buzelin, [Pathologic anatomy of infiltrating non-epithelial tumors of the bladder]. *Prog Urol*, 2002. **12**(5): p. 805-17.
2. Renaudin, K., A. Moreau, and F. Buzelin, [Pathologic anatomy of infiltrating epithelial tumors of the bladder]. *Prog Urol*, 2002. **12**(5): p. 787-802.
3. Landry, J.L., *Interêt diagnostique, précision et valeur pronostique de la cytologie urinaire initiale dans les tumeurs de vessie*. 2001: Lyon.
4. *Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet*, 2003. **361**(9373): p. 1927-34.
5. Peyromaure, M. and M. Zerbib, [Review of the value of BCG maintenance therapy in superficial bladder tumours]. *Prog Urol*, 2004. **14**(1): p. 105-8.
6. Saint, F., et al., [Mechanisms of action of BCG: towards a new individualized therapeutic approach?]. *Prog Urol*, 2000. **10**(6): p. 1118-26.
7. Lamm, D.L., *BCG immunotherapy for transitional-cell carcinoma in situ of the bladder*. *Oncology (Williston Park)*, 1995. **9**(10): p. 947-52, 955, discussion 955-65.
8. Nseyo, U.O. and D.L. Lamm, *Immunotherapy of bladder cancer*. *Semin Surg Oncol*, 1997. **13**(5): p. 342-9.
9. Rischmann, P., et al., [Prospective study of the results at 2 years of one or two cycles of BCG endovesical instillations in the urothelial tumors of the bladder pT1 G3 after completed transurethral resection]. *Prog Urol*, 2005. **15**(6 Suppl 1): p. 1266-70.
10. Goldwasser, F., *Cours à l'IFSBM: Principes et pratique de chimiothérapie*. 2006.
11. Millikan, R., et al., *Integrated therapy for locally advanced bladder cancer: final report of a randomized trial of cystectomy plus adjuvant M-VAC versus cystectomy with both preoperative and postoperative M-VAC*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(20): p. 4005-13.
12. Grossman, H.B., et al., *Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(9): p. 859-66.
13. Bamias, A., et al., *Docetaxel and cisplatin with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) versus MVAC with G-CSF in advanced urothelial carcinoma: a multicenter, randomized, phase III study from the Hellenic Cooperative Oncology Group*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(2): p. 220-8.
14. Theyer, G. and G. Hamilton, [Role of multi-drug resistance in genito-urinary tumors]. *Prog Urol*, 1993. **3**(3): p. 385-92; discussion 392-3.
15. Siegmund, M.J., et al., *Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins*. *Urol Res*, 1999. **27**(3): p. 157-63.
16. CHVÁLOVÁ, K., *Protein recognition of DNA modified by platinum antitumor complexes*. 2006, Université Paris V- René Descartes; Masaryk University in Brno: Paris-Brno. p. 129.
17. Russell, P.L. and F.J. Sharom, *Conformational and functional characterization of trapped complexes of the P-glycoprotein multidrug transporter*. *Biochem J*, 2006. **399**(2): p. 315-23.
18. Lewin, J.M., et al., *The direct effect of nuclear pores on nuclear chemotherapeutic concentration in multidrug resistant bladder cancer: the nuclear sparing phenomenon*. *J Urol*, 2007. **177**(4): p. 1526-30.
19. Sato, H., et al., *MDR1 transcript levels as an indication of resistant disease in acute myelogenous leukaemia*. *Br J Haematol*, 1990. **75**(3): p. 340-5.
20. Scher, H.I. and L. Norton, *Chemotherapy for urothelial tract malignancies: breaking the deadlock*. *Semin Surg Oncol*, 1992. **8**(5): p. 316-41.
21. Scher, H.I. and T.A. Splinter, *Neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: future directions*. *Semin Oncol*, 1990. **17**(5): p. 635-8.
22. Sugawara, I., *Expression and functions of P-glycoprotein (mdr1 gene product) in normal and malignant tissues*. *Acta Pathol Jpn*, 1990. **40**(8): p. 545-53.
23. Lou, P.J., et al., *Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(11): p. 2692-8.

24. Shirakawa, T., et al., *Drug-resistant human bladder-cancer cells are more sensitive to adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy compared to drug-sensitive cells*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(2): p. 282-9.
25. Sternberg, C.N., et al., *M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium*. *J Urol*, 1988. **139**(3): p. 461-9.
26. [Chemotherapy terminology]. *Prog Urol*, 2002. **12**(5): p. 963-7.
27. Gewirtz, D.A., *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. *Biochem Pharmacol*, 1999. **57**(7): p. 727-41.
28. Frederick, C.A., et al., *Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin*. *Biochemistry*, 1990. **29**(10): p. 2538-49.
29. Chaires, J.B., N. Dattagupta, and D.M. Crothers, *Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid*. *Biochemistry*, 1982. **21**(17): p. 3933-40.
30. Deprez-De Campeneere, D., [Study of the daunomycin-DNA complex]. *Mem Acad R Med Belg*, 1974. **47**(4): p. 215-57.
31. Johnston, F.P., et al., *Interaction of anthracyclines with DNA and chromosomes*. *Chromosoma*, 1978. **68**(2): p. 115-29.
32. Pigram, W.J., W. Fuller, and L.D. Hamilton, *Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA*. *Nat New Biol*, 1972. **235**(53): p. 17-9.
33. Alegria, A.E. and P. Riesz, *Photochemistry of aqueous adriamycin and daunomycin. A spin trapping study with ¹⁷O enriched oxygen and water*. *Photochem Photobiol*, 1988. **48**(2): p. 147-52.
34. Alegria, A.E., et al., *Free radicals induced by adriamycin-sensitive and adriamycin-resistant cells: a spin-trapping study*. *Biochemistry*, 1989. **28**(21): p. 8653-8.
35. Schwaller, M.A., et al., *Transferts de protons impliqués dans l'accumulation intracellulaire de molécules antitumorales*. *L'actualité chimique*, 1991. **Janvier-Février**: p. 67-71.
36. Pascu, M.L., et al., *Methotrexate as a photosensitizer*. *Anticancer Res*, 2004. **24**(5A): p. 2925-30.
37. Andreoni, A., et al., *Triplet state characteristics and singlet oxygen generation properties of anthracyclines*. *Biochim Biophys Acta*, 1989. **990**(2): p. 190-7.
38. de Lange, J.H., et al., *Quantification by laser scan microscopy of intracellular doxorubicin distribution*. *Cytometry*, 1992. **13**(6): p. 571-6.
39. Gan, Y., et al., *Pharmacodynamics of doxorubicin in human bladder tumors*. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(8): p. 1275-83.
40. Block, T., et al., *In-vitro cell growth of human urothelial tumor cell lines under exposure with IL-3, GM-CSF, G-CSF and by combined administration with methotrexate, vinblastine, adriamycin and cisplatin*. *Investig Urol (Berl)*, 1994. **5**: p. 91-4.
41. Kharasch, E.D. and R.F. Novak, *The molecular basis for complexation of adriamycin with flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide*. *Arch Biochem Biophys*, 1981. **212**(1): p. 20-36.
42. Tang, K., N.N. Pan, and G.L. Zhang, *Studies of Adriamycin Binding to Histone H1 by Resonant Mirror Biosensor and Fluorescence Spectroscopy*. *Analytical Letters*, 2005. **38**: p. 2151-2164.
43. Dupou-Cezanne, L., A.M. Sautereau, and J.F. Tocanne, *Localization of adriamycin in model and natural membranes. Influence of lipid molecular packing*. *Eur J Biochem*, 1989. **181**(3): p. 695-702.
44. Constantinides, P.P., et al., *Transverse location of anthracyclines in lipid bilayers. Paramagnetic quenching studies*. *Biophys Chem*, 1990. **35**(2-3): p. 259-64.
45. Goormaghtigh, E., et al., *Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity*. *Biophys Chem*, 1990. **35**(2-3): p. 247-57.
46. *Chromosoma*. Vol. 46. 1974. 255.
47. Presley, A.D., K.M. Fuller, and E.A. Arriaga, *MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003. **793**(1): p. 141-50.
48. Bolte, S. and F.P. Cordelieres, *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. *J Microsc*, 2006. **224**(Pt 3): p. 213-32.
49. Irani, J., et al., [Urothelial tumors]. *Prog Urol*, 2004. **14**(4 Suppl 1): p. 957, 959-96.
50. McGovern, F., et al., *Establishment and characterization of a doxorubicin-resistant human bladder cancer cell line (MGH-U1R)*. *J Urol*, 1988. **140**(2): p. 410-4.

CONCLUSION GENERALE

Au cours des dix dernières années, l'utilisation des nouvelles méthodes d'imagerie et de diagnostic s'est largement répandue dans le domaine médical et dans la recherche biomédicale. Actuellement, les avancées technologiques ne cessent de progresser en terme de performance, de convivialité (facilité d'utilisation et d'exploitation des résultats) et de coût. Mais il reste encore de nombreux champs d'investigations pour accroître la sensibilité et la spécificité des diagnostics.

Dans ce contexte, la microscopie de fluorescence est devenue un outil idéal pour observer les différents types d'échantillons biologiques, qu'ils soient fixés ou vivants, d'autant plus que les méthodes utilisant la fluorescence permettent de faire le lien entre le comportement *in vitro* et *in vivo* des biopolymères et sont tout à fait adaptées à l'étude non destructive des cellules ou des tissus biologiques

La première partie de ce travail de thèse, tournée vers le développement d'une nouvelle instrumentation, avait pour objectif d'améliorer la technique de microscopie de fluorescence biphotonique, traditionnellement utilisée pour l'imagerie de fluorescence résolue en temps, en diminuant le temps d'acquisition des images de durée de vie.

Le microscope biphotonique multipoints

Nous avons démontré les potentialités du système développé, appelé microscope multiphoton multipoints (MMM). L'utilisation d'une matrice de 64 points d'excitation couplée à un système de caméra/porte-temporelle pour la détection, a permis d'améliorer drastiquement le temps d'acquisition des images de durée de vie de fluorescence d'au moins un facteur 40 par rapport au dispositif d'excitation monopoint mis en place sur IDEFIX. La pertinence de notre système a été prouvée lors de l'étude d'un système biologique impossible à étudier en microscopie biphotonique monopoint. Nous avons ainsi acquis des images 3D résolues temporellement, de cellules humaines d'une tumeur du colon incubées avec un photosensibilisateur, le PPME. Nous avons essayé par l'acquisition des images FLIM, d'apporter un nouvel éclairage sur les propriétés photophysiques de ce photosensibilisateur au sein des cellules. Du point de vue technologique, certaines améliorations peuvent encore être apportées en vue d'étendre le champ d'application de notre système aux échantillons épais et d'augmenter les configurations d'utilisation du montage, notamment pour pouvoir faire de l'imagerie FCS.

Le deuxième axe de ce travail a été développé une étroite collaboration avec les médecins afin de répondre au mieux à leurs besoins sans modifier profondément leurs pratiques expérimentales. Le but a été de mettre au point des protocoles, utilisant la fluorescence comme facteur de contraste, pour faciliter le diagnostic médical.

Aide au diagnostic médical

Nous avons utilisé la microscopie de fluorescence (intensité, spectre et durée de vie de fluorescence) pour mettre au point une méthode qui vise à améliorer la sensibilité du diagnostic précoce des cancers du col de l'utérus. La mise au point de cette méthode a fait l'objet de la deuxième partie de ce manuscrit dans laquelle nous avons présenté les résultats obtenus en microscopie de fluorescence sur des lames cytologiques. Il s'est avéré que la coloration pentachromique de ces échantillons (protocole de Papanicolaou) jouait un rôle important dans le signal de fluorescence émis et que l'autofluorescence des cellules de ces lames cytologiques ne pouvait en aucun cas être utilisée comme facteur de contraste pour améliorer le diagnostic précoce des cancers du col utérin.

L'analyse du signal de fluorescence émis par ces échantillons a permis de différencier les cellules en prolifération ou présentant une activité mitotique, des cellules désquamantes ou quiescentes. En effet, un fort halo de fluorescence périmembranaire a été détecté sur ces cellules en activité alors que les autres cellules présentent une fluorescence uniquement intracellulaire.

Ce phénomène s'explique par l'accumulation d'un des colorants utilisés lors de la préparation des échantillons (le EA50) sur la membrane externe des cellules. Nous avons également pu démontrer que l'observation par imagerie d'intensité de fluorescence des lames cytologiques colorées selon le protocole de Papanicolaou permet d'accroître la sensibilité du diagnostic de lames classées ASC-US ou ASC-H présentant des cellules atypiques. L'avantage de cette méthode est qu'elle peut être effectuée avec un simple microscope d'épifluorescence en parallèle de l'observation classique en transmission faite par l'anatomopathologiste. Ce protocole fait actuellement l'objet de tests cliniques.

Le développement de ce type de protocole est d'autant plus intéressant que la détection des tumeurs à un stade précoce augmente grandement les chances de survie des patients. Quoiqu'il en soit, dans le cas où le cancer n'a pas pu être diagnostiqué suffisamment tôt, il est impératif de porter un effort particulier sur l'optimisation du traitement pour maximiser les chances de succès des thérapies.

Ce fut l'objet de la troisième partie de ce travail. La chimiothérapie est incontournable dans le traitement des cancers urothéliaux en tant que composante d'un programme complet de soins incluant la chirurgie et/ou la radiothérapie. Cependant, plusieurs obstacles peuvent minimiser les chances de rémission du patient, notamment les résistances à certains agents antitumoraux, acquises au cours du traitement ou déjà présentes dans les tumeurs sont très préjudiciables.

Nous avons porté nos efforts sur la détection de ces résistances en mettant en place une démarche expérimentale très similaire à celle exposée dans la seconde partie. Un test des résistances aux chimiothérapies combinées a ainsi été développé dans le cadre de ma thèse. Les cancers urothéliaux ont été pris comme modèle d'étude et dans ce cas, la chimiothérapie combinée la plus couramment prescrite est le MVAC. Ce traitement associe quatre molécules: le méthotrexate, la vinblastine, l'adriamycine et le cis-platine.

Du fait de l'instrumentation dont nous disposons au laboratoire, seule les propriétés de fluorescence de la doxorubicine ont été exploitées. Une étude des propriétés photophysiques du MVAC en solution a donc été réalisée, suivie d'une étude en milieu cellulaire. Pour cette dernière, quatre lignées cellulaires différentes ont été utilisées comme modèle, dont une lignée cellulaire cancéreuse sensible aux agents antitumoraux et son pendant résistant. A l'issue de cette étude, nous avons identifié une signature de fluorescence nous permettant de discriminer les cellules résistantes des cellules sensibles à la polythérapie MVAC. Sur cette base, un protocole facile à mettre en œuvre et adapté au milieu hospitalier a été mis en place à partir des urines des patients. Pour le moment, cette méthode n'a été testée que sur un patient atteint d'une tumeur infiltrante. Néanmoins, les premiers résultats sont tout à fait prometteurs. Cette méthode requiert désormais l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons afin d'évaluer sa sensibilité et sa spécificité.

« À quoi comparer
Notre vie en ce monde?
À la barque partie
De bon matin
Et qui ne laisse pas de sillage. »
Tanka japonais ...

Alors...

Mousse au chocolat et gingembre comme au coin de la rue...

Ingrédients :

- 240g de chocolat noir cassé en morceaux
- 60g de beurre ½ sel
- 6 oeufs jaunes et blancs séparés
- 60g de sucre
- 1 càc de gingembre frais râpé très très fin

Protocole expérimental :

Mettez dans un saladier le chocolat et le beurre, passez le tout au micro-onde jusqu'à ce qu'ils soient bien fondus, mélangez le tout de manière à obtenir un mélange homogène, ajoutez le gingembre (ajoutez le petit à petit jusqu'à ce que ce soit à votre goût) et remélangez.

Fouettez les blancs en neige bien ferme avec une pincée de sel. Mettez les jaunes et le sucre dans un autre saladier et battez le tout jusqu'à obtenir un mélange blanchi et bien mousseux. Versez ce mélange sur le chocolat et mélangez bien à la cuillère.

Ajoutez ensuite un tiers des blancs et mélangez vigoureusement. Puis ajoutez le reste des blancs délicatement à la cuillère en soulevant bien la mousse, il ne faut plus voir les blancs mais ne pas trop insister non plus.

Versez dans des pots et laissez prendre quelques heures au frigo avant de déguster.

« Mais pourquoi est-ce que je vous raconte ça ? » le blog de Dorian

Résumé : L'utilisation de la microscopie confocale et biphotonique de fluorescence est de plus en plus répandue dans le domaine biomédical. En effet, l'imagerie d'intensité, de spectre et de durée de vie de fluorescence permettent de détecter, quantifier et imager les composants fluorescents intrinsèques d'un milieu biologique ainsi que les sondes extrinsèques.

Dans le cadre du dépistage précoce de cancer, les modes de détection non-invasifs actuellement mis en place manquent de sensibilité pour permettre d'établir de manière fiable un diagnostic. Les médecins ont alors recours à des examens complémentaires, invasifs, comme la biopsie. Dans le cas de notre étude, différentes techniques de microscopie ont été exploitées pour mettre en place une méthode de diagnostic précoce non-invasive de cancer. Nous avons ainsi utilisé conjointement la microscopie confocale résolue spectralement et la microscopie biphotonique pour les images de durée de vie de fluorescence (FLIM). Cette dernière technique a d'ailleurs été récemment optimisée avec la mise en place d'un système d'excitation biphotonique multipoint qui permet d'accélérer significativement la vitesse d'acquisition des images. Il s'agit d'un système optique générant une matrice de 64 faisceaux excitateurs ce qui réduit considérablement le temps d'exposition des échantillons biologiques, les préservant ainsi des photodégradations.

Ces techniques, largement complémentaires, ont permis de différencier, sur différents types de cytologies, les cellules présentant une faible malignité des cellules saines en utilisant comme facteur de contraste la fluorescence des entités intracellulaires. Grâce à cette méthode, les cellules de bas grades de malignité ont pu ainsi être identifiées sur des cytologies du col de l'utérus.

En s'appuyant sur une démarche expérimentale similaire, un nouveau test a également été élaboré permettant de déceler avant traitement chez un patient une résistance à des polychimiothérapies usuellement utilisées dans le traitement des cancers urothéliaux tel que M-VAC. A l'issue de ce travail, une signature spectroscopique permettant de discriminer les cellules résistantes des cellules sensibles à la polychimiothérapie a pu être identifiée.

Mots-clés : microscopie biphotonique multipoints, imagerie de fluorescence, diagnostic médical, cancer, col de l'utérus, résistance, polychimiothérapie, urothélial

Abstract: Confocal and two-photon microscopies are key methods for biomedical research and cells or tissue imaging. However, one of the main drawbacks of the conventional two-photon microscope is the imaging speed. Consequently, the first aim of this work was to speed up acquisition in order to preserve samples from too long experiments. In this context, we have developed an original set-up called multifocal multiphoton microscope composed of an optical system creating an 8x8 beam array.

The second aspect of this work was to develop new methods of medical diagnosis. An early diagnosis of malignant tumors is essential to increase the therapy success and the patient's survival. But, the current standard to diagnose the presence of tumoral cells is of limited value because of its low sensitivity especially to atypical cells. Thus, the enhancement of early cancer diagnosis and treatment has involved the development of new methods to identify cancer signatures. For that purpose, we have an interest in fluorescence imaging methods for *ex vivo* diagnosis of cervix cancers.

We then applied the same approach to detect possible resistance to drugs currently used in bladder chemotherapy. At the present time, patients attacked by a bladder cancer can be efficiently treated with combined chemotherapy such as M-VAC, but drug resistance may appear.

In order to detect possible resistance to M-VAC, we have developed an *ex vivo* method from urinary samples, based upon the visible excitation of the drug fluorescence. Such pre-treatment step which does not exist at the present time will constitute a reliable, non constraining and inexpensive test enabling us to assess chemotherapy effectiveness.

Keyword: multifocal multiphoton microscopy, fluorescence imaging, medical diagnosis, cancer, cervix, resistance, polychemotherapy, bladder