

# Table des matières

Introduction	1
I) Cadre théorique	
Introduction	7
A. Effets non linéaires	
i. Polarisation	8
ii. Fluorescence excitée à deux photons	10
iii. Génération de second harmonique	17
iv. Utilisation de la SHG et TPEF en microscopie non linéaire	24
B. Activité optique	
i. Activité optique dans le domaine linéaire	31
ii. Effets non linéaires du second ordre	34
iii. Génération de second harmonique par un film de molécules chirales	36
iv. Modélisations microscopiques de la chiralité	45
C. Conception de colorants membranaires	
i. Chiralité des colorants membranaires	55
ii. Caractéristiques	59
Conclusion	63
II) Techniques expérimentales	
Introduction	65
A. Spectrofluorimètre à deux photons	
i. Principe de fonctionnement	66
ii. Construction et caractéristiques	68
iii. Procédures de réglages	71
B. Expérience de génération de second harmonique en surface	
i. Montage optique	73
ii. Détections	76
C. Microscope à balayage	
i. Principe de fonctionnement	79
ii. Reconstruction des images	82
iii. Objectifs	84
iv. Résolution	85
D. Vésicules unilamellaires géantes	
i. Membranes phospholipidiques	89
ii. Electroformation	91
iii. Observation	94

### III) Etude d'un colorant chiral : l'ASTB

Introduction	97
A. Obtention et caractérisation de l'ASTB	
i. Obtention de l'ASTB	98
ii. Fabrication d'un film d'ASTB	100
iii. Spectres d'absorption de l'ASTB	103
iv. Spectre de fluorescence excitée à deux photons de l'ASTB	108
B. Génération de second harmonique en surface de l'ASTB	
i. Expériences d'ORD	115
ii. Expériences de CD	118
iii. Expériences de LD	122
iv. Activité optique	123
C. Utilisation de l'ASTB en microscopie	
i. Insertion membranaire	129
ii. Imagerie de SHG et de TPEF	131
iii. Toxicité	137
iv. Exemple	139
D. Perspectives	
i. Efficacité en SHG	141
ii. Insertion membranaire	143
Conclusion	145

### IV) Microscopie non linéaire basée sur des contrastes endogènes : étude et applications

Introduction	147
A. Contraste endogène en microscopie multiphotonique	
i. Sources de contraste	148
ii. Exemples	152
iii. Comparaison avec l'histologie classique	162
B. Propriétés de fluorescence de l'élastine et de SHG du collagène	
i. Elastine	165
ii. Collagène	171
C. Application de la microscopie non linéaire à l'étude du tissu vivant	
i. Matériel biologique	183
ii. Effets du lindane sur le système vasculaire du Rat	192
D. Effets de la saxitoxine sur les cellules cardiaques	
i. Motivations	203
ii. Expériences réalisées	204
iii. Résultats	208
Conclusion	213
Références bibliographiques	215

## Introduction :

A toute époque, les progrès de l'Optique ont contribué aux avancées dans la connaissance du vivant. En biologie cellulaire, le microscope reste l'outil central et de nombreuses découvertes, y compris durant les vingt dernières années, sont la conséquence directe du développement de cette technique, en particulier dans le domaine de l'imagerie fonctionnelle tri-dimensionnelle.

L'origine du premier microscope est difficile à dater avec précision. Aux environs de 1595, Zacharias Janssen met au point un ensemble de trois lentilles montées dans un tube qui permet d'imager non pas directement l'objet comme dans le cas d'une loupe, mais l'image agrandie par une optique annexe appelée objectif. Ce microscope grossit entre 3 et 10 fois, il possède de nombreuses aberrations, la lumière traversant des lentilles de courtes focales sous des angles importants.

En 1660, Antoine Von Leeuwenhoek développe un microscope utilisant un globule de verre de 6 mm de diamètre (il fabrique des lentilles biconvexes dont il garde le secret). L'objet est placé à l'extrémité d'une tige que l'on déplace grâce à une vis à crémaillère, le tout est placé dans une monture en bois et grossit entre 50 et 300 fois. Il s'agit du microscope simple. Von Leeuwenhoek était drapier à Delft, il avait créé son premier microscope pour contrôler la qualité des toiles tissées, mais s'intéresse plus aux sciences du vivant. Il a donné naissance à l'histologie et à la protistologie (étude de la formation des tissus vivants). Il découvre en 1677 les spermatozoïdes, les globules rouges, les protozoaires (eucaryotes unicellulaires d'origine animale) malgré les distorsions importantes des images. A la fin du XVII<sup>e</sup> siècle, Hooke améliore encore le dispositif et introduit un oculaire : c'est le microscope composé. Le microscope devient alors un produit commercial.

Durant les trois siècles qui ont suivi, les éléments optiques ont été sans cesse améliorés afin de réduire les aberrations géométriques et chromatiques des objectifs, des oculaires et des systèmes d'illumination.

En 1957, Marvin Minsky propose un microscope « confocal » dans lequel l'utilisation astucieuse d'un diaphragme permet d'imager un point particulier de l'échantillon, autorisant ainsi des « coupes » virtuelles d'un objet tridimensionnel par un balayage point par point. L'utilisation conjointe de cette technique et de marqueurs fluorescents fonctionnalisés permet d'accéder à une observation 3D *in situ* en ciblant très spécifiquement l'objet biologique d'intérêt (organites cellulaires, suivi de macromolécules ...).

Progressivement le domaine d'utilisation du microscope s'étend. De la cellule on passe aux tissus vivants voire à l'organe, du morphologique on évolue vers le fonctionnel. Le développement de nouveaux concepts en optique et leur traduction technologique fait arriver de nouveaux outils dans les laboratoires de biologie. Ainsi les nouveaux lasers très brefs (100 fs) à technologie « tout-solide » permettent de dépasser le stade de la réponse linéaire pour tirer profit d'effets non-linéaires spectaculaires déjà exploités de façon quasi-routinière dans certains laboratoires. Parmi les pionniers dans ce domaine, on peut citer Denk, Strickler et Webb qui introduisent en 1990 la microscopie de fluorescence excitée à deux photons (TPEF) en utilisant des lasers impulsifs infrarouges [Denk, 1990]. La non linéarité de l'interaction impose une absorption à deux photons proportionnelle au carré de l'intensité incidente. Cet effet n'est significatif qu'au foyer d'un objectif, il est ainsi possible d'obtenir une résolution tridimensionnelle intrinsèque. Par ailleurs, l'utilisation d'un rayonnement incident infrarouge permet une pénétration accrue dans les tissus. Les impulsions de durée courte introduisent une énergie faible dans le milieu tout en imposant une puissance crête importante capable d'atteindre le régime de la réponse non linéaire du milieu. Très rapidement, la microscopie non linéaire s'est imposée comme une technique de choix pour des études *in vivo*. Elle a été utilisée notamment en neurologie [Yuste, 1995], en embryologie [Squirrell, 1999] et en cancérologie [Brown, 2001]. Un travail important reste néanmoins à réaliser afin de caractériser et d'interpréter cette réponse non-linéaire génératrice de nouveaux contrastes associés à une réponse moléculaire endogène ou provenant de molécules exogènes.

Une réponse non-linéaire particulièrement exploitée pour ses applications potentielles en biologie est la génération de second harmonique (SHG) *in situ*, phénomène qui va être utilisé dès 1996 comme « révélateur » spécifique des membranes cellulaires. Il s'agit en effet d'un phénomène optique non-linéaire cohérent du second ordre qui s'annule pour tout milieu centrosymétrique et n'est donc sensible qu'aux interfaces. Il est alors possible d'utiliser des

marqueurs « harmonophores » pour imager les membranes plasmiques en SHG [Moreaux, 2001],[Campagnola, 1999], [Ben-Oren, 1996]. Cependant ces marqueurs ont tendance à rapidement s'internaliser et s'équirépartir sur les faces interne et externe de la membrane cellulaire conduisant à un arrangement centrosymétrique qui annule le signal de second harmonique. Afin de pallier cette limitation, A. Lewis propose en 1993 d'utiliser des colorants chiraux [Bouevitch, 1993] (la chiralité est la propriété que possède un objet de ne pas être superposable à son image dans un miroir). Mais il considère des marqueurs présentant une chiralité à un électron, et l'exaltation du signal est peu efficace.

Or des études détaillées du rôle de la chiralité dans la SHG en surface étaient menées depuis quelques années au Laboratoire d'Optique et Biosciences : des expériences de second harmonique résolues en polarisation étaient menées sur des films moléculaires, en lien avec des modélisations de l'activité optique attendue selon le type de chiralité moléculaire. Lors de ce travail de thèse, il restait à valider expérimentalement l'extension du modèle des oscillateurs couplés aux effets chiroptiques non-linéaires. Nous avons pour cela choisi une molécule présentant une chiralité par couplage excitonique, une base de Troger substituée par des acridines (ou ASTB), dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon.

L'étude de cette molécule chirale a alors été menée dans un double but. Tout d'abord, il s'agissait de valider expérimentalement nos modélisations de l'activité optique non-linéaire. Ensuite, grâce justement à cette meilleure compréhension du rôle de la chiralité dans la génération de second harmonique, il s'agissait de définir le type de colorant membranaire chiral adéquat en microscopie de second harmonique. Nous verrons que cela nous a conduit à privilégier un couplage excitonique à une chiralité à un électron et à tester l'ASTB en microscopie non-linéaire.

Cependant, la microscopie de second harmonique ne se limite pas à l'étude des membranes. Dès 1986, Freund [Freund, 1986] ont imagé des fibres de collagène dans la queue de rats sans coloration. Ces structures tissulaires sont en effet très denses et très bien orientées, et émettent de forts signaux de second harmonique. Il en est de même des filaments de myosine dans les muscles, ou des microtubules [Guo, 1997]. Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation de contrastes optiques endogènes en microscopie SHG en combinant là encore deux points de vue. Tout d'abord, nous voulions étudier ces signaux sous une approche fondamentale, notamment par des expériences résolues en polarisation, puisqu'il avait été proposé que l'efficacité du collagène en SHG était liée à sa structure chirale. Ensuite,

nous voulions développer une application biologique concrète afin de démontrer tout le potentiel de ces techniques pour l'étude de tissus vivants à l'échelle micrométrique.

La présentation de ce travail se décompose en quatre chapitres.

Le premier chapitre décrit le cadre théorique sur lequel s'appuie ce travail expérimental. Nous y introduisons les phénomènes de TPEF, de SHG et leur intérêt en microscopie non linéaire. Nous décrivons plus particulièrement la SHG générée par une surface. Nous proposons deux modèles, celui de Kuhn (couplage entre oscillateurs) et celui de Kauzmann (mouvement hélicoïdal des charges), tous deux étendus au domaine non linéaire afin de rendre compte des différents mécanismes à l'origine de la chiralité des molécules. Nous exposons alors pourquoi la chiralité du colorant est une source d'amélioration de l'imagerie membranaire en SHG. Nous précisons dans la dernière partie de ce chapitre quel type de chiralité doit être présenté par le nouveau colorant que nous cherchons à mettre au point. Nous détaillons également l'ensemble des propriétés qu'il doit posséder pour être utilisable en microscopie.

Le second chapitre introduit les différentes techniques expérimentales mises en œuvre dans ces recherches. Tout d'abord, nous présentons le spectrofluorimètre conçu pour l'étude des propriétés de fluorescence (émission et excitation) à deux photons des colorants ou des protéines utilisés. L'expérience de résolution en polarisation du signal de second harmonique réfléchi par un film est détaillée dans la seconde partie de ce chapitre. Elle permet une étude pertinente de la chiralité des molécules contenues dans le film. Nous présentons ensuite le microscope à balayage développé au Laboratoire d'Optique et Biosciences utilisé pour l'imagerie combinée de TPEF et de SHG. Enfin, la synthèse de vésicules unilamellaires géantes ( $50 \mu\text{m}$ ) est détaillée dans la dernière partie. Ces vésicules font partie de la procédure d'étude des colorants chiraux de SHG pour tester leur insertion membranaire.

Le chapitre trois présente les résultats expérimentaux obtenus sur le prototype de marqueur chiral par couplage entre oscillateurs : l'ASTB. Nous détaillons tout d'abord ses propriétés de fluorescence et d'absorption. Nous présentons ensuite les expériences de second harmonique généré en surface par un film d'ASTB. Nous confrontons alors nos résultats expérimentaux de façon qualitative et quantitative au modèle de Kuhn étendu au non linéaire. Des images réalisées sur des vésicules unilamellaires géantes avec l'ASTB permettent de discuter son

insertion membranaire. A partir de ces résultats, nous proposons enfin les voies d'amélioration possibles de ce colorant.

Le dernier chapitre concerne la microscopie non linéaire en contraste endogène tant en SHG qu'en TPEF. Nous commençons par présenter les différents composés sources de contraste. Parmi eux, nous utilisons l'élastine (fluorescente) et le collagène (SHG) présents dans le tissu conjonctif. Nous nous appuyons sur les exemples précis de la peau et du foie pour démontrer les nombreux avantages de la microscopie non linéaire vis-à-vis de l'histologie classique. Nous étudions plus précisément les propriétés de fluorescence de l'élastine et de SHG du collagène. Nous allons démontrer comment ces protéines permettent d'étudier précisément la morphologie du tissu artériel du Rat. Un exemple de déformations induites par un toxique, le lindane, sera traité pour illustrer la complémentarité de l'imagerie de TPEF et de SHG pour l'observation de tissus vivants en profondeur.

Un exemple de toxicologie est exposé pour démontrer l'apport de l'imagerie de second harmonique endogène. Nous avons quantifié les déformations de cellules atriales de cœur de grenouille soumises à l'action de la saxitoxine (STX), en observant les têtes globulaires de myosine.



# **Chapitre I**

## **Cadre théorique**

Ce chapitre a pour objet d'introduire les notions théoriques permettant d'interpréter les expériences réalisées dans ce travail. Ces expériences essayent de faire ressortir le rôle de la chiralité en microscopie SHG.

Afin de préciser les processus physiques mis en jeu dans ces nouveaux contrastes, nous introduisons dans la partie A la fluorescence excitée à deux photons (TPEF) et la génération de second harmonique (SHG). Dans cette même partie nous rappelons également ce que ces deux types d'interactions apportent à la microscopie.

Dans la partie B, nous présentons l'activité optique des molécules chirales. Une introduction de modèles microscopiques phénoménologiques nous permet de mieux cerner l'origine physique de la chiralité. Nous montrons en quoi, l'utilisation d'expériences de résolution en polarisation du signal de second harmonique généré en surface, nous permet d'accéder à une compréhension des mécanismes physiques intervenant dans l'activité optique.

Le problème de la conception de nouveaux colorants membranaires pour l'imagerie de second harmonique est abordé dans la dernière partie. Ce problème est complexe car de nombreux paramètres parfois contradictoires sont à optimiser au sein d'une même molécule. Pour cela, notre approche se focalise sur un paramètre particulier : la chiralité des colorants. Nous exposons l'avantage de travailler avec un marqueur chiral, et quel type précis de chiralité doit être utilisé. Les propriétés des colorants membranaires pour l'imagerie non linéaire sont également précisées dans cette dernière partie.

## I) A. Effets non linéaires

Dans la partie i., nous allons définir le moment dipolaire et la polarisation d'une assemblée de dipôles pour introduire, ensuite, aux parties ii et iii, les phénomènes de fluorescence excitée à deux photons et de génération de second harmonique. Dans la dernière partie iv, nous montrerons que ces processus non linéaires peuvent être utilisés en microscopie.

Lorsque le champ électrique d'une onde incidente possède une intensité comparable à celle du champ responsable de la cohésion de la matière, il est possible de générer des effets non linéaires. Le champ électrique liant un électron au noyau d'hydrogène vaut typiquement  $5 \cdot 10^{11}$  V/m, le champ électrique associé à l'onde émise par un laser pulsé où la durée des impulsions vaut 100 fs et l'énergie 1 mJ pour un faisceau d'1 mm vaut  $2 \cdot 10^9$  V/m. Dans ces conditions la matière répondra de façon non linéaire au champ incident, le champ électromagnétique rayonné pourra se décomposer comme une série d'harmoniques du champ incident. Cette comparaison d'ordres de grandeur permet de comprendre la liaison extrêmement forte existante entre les lasers pulsés et l'électromagnétisme non linéaire. En effet, autrefois, les lampes à arc les plus puissantes (500W) en utilisant un condenseur placé à 10 cm des électrodes et de 10 cm de diamètre focalisant le faisceau dans un disque d'1mm de diamètre, ne permettaient pas d'obtenir des intensités de champ supérieures à  $10^5$  V/m, valeur de quatre ordres de grandeur inférieure aux  $2 \cdot 10^9$  V/m cités précédemment.

C'est donc l'avènement des lasers pulsés qui a permis de travailler sur des signaux harmoniques d'intensité suffisamment confortable et de réaliser de nombreuses études des interactions non linéaires entre la lumière et la matière.

### i. Polarisation

- Dipôle individuel :

En se plaçant à l'échelle atomique, un champ électrique extérieur déforme le nuage électronique des molécules (pour des effets non résonnantes). Les barycentres des charges de signe opposé sont déplacés, un moment dipolaire est donc induit par le champ extérieur. Le déplacement des deux barycentres est proportionnel aux puissances multiples du champ électrique. On en déduit une expression du moment dipolaire  $\rho$  d'une molécule :

$$\underline{p} = \underline{\underline{\alpha}}\underline{E} + \frac{1}{2}\underline{\underline{\beta}}\underline{E}\underline{E} + \frac{1}{6}\underline{\underline{\gamma}}\underline{E}\underline{E}\underline{E} + \dots \quad (\text{I.A-1})$$

Un moment dipolaire permanent de la molécule peut éventuellement être introduit.  $\alpha$  désigne la polarisabilité linéaire,  $\beta$  et  $\gamma$  les hyperpolarisabilités du premier et du second ordre (tenseurs de rang 3 et 4) [Bloembergen, 1965].

- Polarisation pour un ensemble de dipôle :

La polarisation macroscopique est la moyenne vectorielle de toutes les moments dipolaires contenus dans le volume V :

$$\underline{P} = \frac{1}{V} \sum_i \underline{p}_i \quad (\text{I.A-2}).$$

La polarisation macroscopique résulte donc d'un moyennage spatial des moments dipolaires. Elle s'écrit en fonction du champ électrique dans le domaine linéaire :

$$\underline{P}(\omega) = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}} \underline{E}(\omega) \quad (\text{I.A-3}).$$

Une polarisation macroscopique permanente peut être présente dans le milieu en l'absence de tout champ extérieur comme pour les ferroélectriques, (distribution non isotrope des dipôles permanents). Un dipôle n'est pas uniquement soumis au champ extérieur, il subit le champ créé par les autres dipôles qui l'entourent. La résultante de ces deux contributions est notée sous la forme d'un champ local :  $\underline{E}_l$ . La quantité permettant de relier le champ électrique extérieur ( $\underline{E}(\omega)$ ) à la polarisation est appelée susceptibilité linéaire ( $\chi$ ). Elle dépend de la densité volumique N de dipôles.

Lorsque le champ extérieur devient non négligeable vis-à-vis du champ reliant les électrons aux noyaux, il faut tenir compte des non linéarités induites à l'ordre 2 et plus.

On obtient la susceptibilité du second ordre en sommant les hyperpolarisabilités individuelles. Il en résulte un moyennage orientationnel des hyperpolarisabilités définies dans le repère moléculaire. Des composantes peuvent être non nulles pour une molécule individuelle et se moyenner à zéro suivant l'arrangement spatial de l'assemblée de molécules. On obtient alors l'expression :

$$\underline{\underline{\chi}}^{(2)} = \frac{1}{V} \langle \underline{\underline{\beta}} \rangle \quad (\text{I.A-4}).$$

Suivant les distributions des molécules dans l'espace, certaines composantes de la susceptibilité  $\chi_{ijk}^{(2)}$  seront non nulles. D'autres composantes s'annulent bien que certaines composantes des hyperpolarisabilités soient différentes de zéro pour une molécule isolée. C'est le moyennage qui, dans ce cas, conduira à des valeurs macroscopiques nulles. Ceci sera traité en détail pour les configurations géométriques qui nous intéressent par la suite.

Nous en déduisons une expression de la polarisation macroscopique d'ordre 2 :

$$\underline{P} = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)} \underline{EE} \quad (\text{I.A-5}).$$

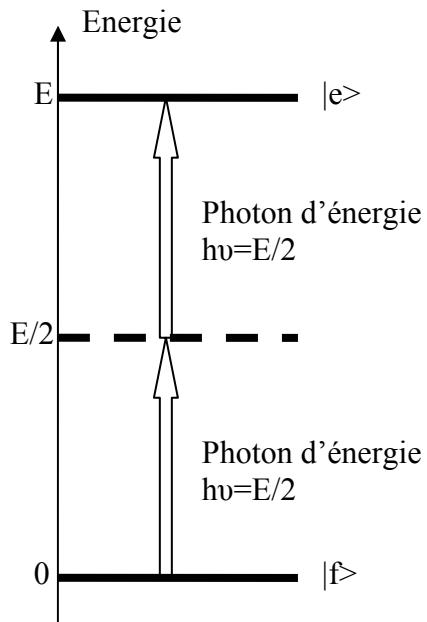
## ii. Fluorescence excitée à deux photons

- Définition :

L'émission d'un signal de fluorescence à partir d'un niveau excité d'un chromophore est précédée d'une excitation qui porte le système dans cet état excité. Cette excitation se fait dans notre étude par l'absorption de deux photons de caractéristiques identiques [Göppert-Mayer, 1931], nous parlerons de fluorescence excitée à deux photons (TPEF).

L'absorption non linéaire de deux photons correspond à la partie imaginaire de l'hyperpolarisabilité du second ordre  $\text{Im}(\gamma)$  dans l'équation I.A-1.

Cette absorption est représentée sur la figure I.A.1 pour un système modèle à deux niveaux d'énergie,  $|e\rangle$  correspond à l'état excité,  $|f\rangle$  à l'état fondamental.



**Figure I)A.1 :** représentation d'un système à deux niveaux d'énergie  $|e\rangle$  et  $|f\rangle$ , il y apport d'énergie externe par absorption de deux photons identiques.

Nous nous intéresserons que plus tard à la désexcitation par émission d'un photon de fluorescence, le caractère non linéaire de ce phénomène ne provenant que de l'absorption de deux photons pour un même chromophore.

Il est possible de relier la probabilité de transition à 2 photons de  $|f\rangle$  à  $|e\rangle$  par unité de temps :  $w^{(2)}$ (en  $s^{-1}$ ), à la section efficace d'absorption à 2 photons  $\sigma^{(2)}$  à partir de l'équation I.A-6 (scalaire après une intégration sur toutes les directions de l'espace).  $\omega$  est la pulsation du rayonnement incident, et  $I(\omega)$  son intensité associée (en Watt/cm<sup>2</sup>) [Shen, 1984]. La division de l'intensité par l'énergie d'un photon, donne le flux de photons incidents en photons/s/cm<sup>2</sup>.

$$w^{(2)} = \frac{\sigma^{(2)} I^2(\omega)}{\hbar^2 \omega^2} \quad (\text{I.A-6}).$$

Cette probabilité est proportionnelle à l'intensité incidente au carré ce qui traduit bien le caractère non linéaire de l'absorption.

L'expression de la section efficace à partir de  $\text{Im}(\gamma)$  s'écrit :

$$\sigma^{(2)} = \frac{4\pi^2 \hbar \omega^2}{n^2 c^2} \text{Im}(\gamma) \quad (\text{I.A-7}).$$

$\sigma^{(2)}$  dépend de la longueur d'onde comme cela apparaît dans l'expression I.A-7, et  $\gamma$  possède également une dépendance spectrale qui est propre à chaque chromophore. Elle s'exprime en  $\text{cm}^4(\text{photons/s})^{-1}$ .

Il est possible d'estimer les ordres de grandeur des différentes sections efficaces.

- Ordres de grandeur :

En associant une section efficace d'absorption à un photon  $\sigma^{(1)}$  de  $10^{-18} \text{ cm}^2$ , la section efficace à deux photons  $\sigma^{(2)}$  est proportionnelle au carré de  $\sigma^{(1)}$  par un temps de  $10^{-14} \text{ s}$  (temps de cohérence entre les états  $|e\rangle$  et  $|f\rangle$ ), elle vaut typiquement  $10^{-50} \text{ cm}^4(\text{photons/s})^{-1}$ . On utilise aussi l'unité Göppert-Mayer (GM) valant  $10^{-50} \text{ cm}^4(\text{photons/s})^{-1}$ .

Afin de pouvoir comparer les absorptions à un et deux photons, il faut considérer  $\frac{\sigma^{(2)}I}{\hbar\omega}$  et  $\sigma^{(1)}$  entre lesquelles il y a un rapport  $10^5$  pour une intensité  $I$  de l'ordre du GigaWatt par  $\text{cm}^2$  à une longueur d'onde de  $1 \mu\text{m}$ .

Si deux photons arrivent dans une fenêtre temporelle inférieure à  $10^{-14} \text{ s}$ , il peut y avoir absorption simultanée de deux photons par le même chromophore. C'est cette échelle de temps qui explique l'utilisation de laser femtoseconde (typiquement entre 50 fs et 100 fs) pour rendre non négligeable l'absorption à deux photons. La fluorescence excitée à deux photons nécessite un grand nombre de photons au même endroit de l'espace, ceci est possible grâce à la focalisation apportée par une lentille convergente ou par un objectif de microscope.

La puissance moyenne est faible si les impulsions sont suffisamment espacées temporellement (typiquement :  $10^{-8} \text{ s}$  dans nos expériences) et le flux lumineux n'endommagera pas l'objet. Les lasers femtoseconde Ti:Saphire commerciaux fournissent des impulsions comprises entre 70 et 120 fs avec des puissances moyennes de l'ordre d'1W et une puissance instantanée qui vaut  $10^5 \text{ W}$  (expression I.A-9). La probabilité d'absorption de deux photons est  $10^5$  fois plus élevée avec ce laser pulsé qu'avec un laser continu de même intensité moyenne.

$$P_{inst} = \frac{\bar{P} \cdot \Delta T}{\tau} \quad (\text{I.A-8}).$$

avec  $\Delta T=10^{-8}$  s désigne le temps séparant deux impulsions (correspondant à la longueur du chemin optique dans la cavité de l'oscillateur divisée par la vitesse de la lumière),  $\tau=100$  fs désigne la largeur temporelle à mi-hauteur d'une impulsion laser et  $\bar{P}$  correspond à la puissance moyenne mesurée.

Estimons la probabilité d'absorption à deux photons pour un chromophore possédant une section efficace de  $10^{-2}$  GM en microscopie (ordre de grandeur pour le colorant utilisé dans ce travail). La puissance moyenne mesurée vaut 10 mW, ce qui correspond à une puissance crête d'1 kW pour un oscillateur Ti : Saphir délivrant des impulsions de 100 fs à une fréquence de 100 MHz. Cette puissance correspond à une énergie par impulsion de  $10^{-10}$  J. L'énergie d'un photon à 800 nm est de  $2,5 \cdot 10^{-19}$  J. Chaque impulsion contient donc  $4 \cdot 10^8$  photons. Le flux de photons est de  $4 \cdot 10^{21}$  photons/s. Un objectif de microscope d'ouverture numérique 0.75 peut focaliser le faisceau incident sur un rayon de 0,25  $\mu\text{m}$ , soit une surface de  $2 \cdot 10^{-9}$   $\text{cm}^2$ . L'intensité résultante au foyer de l'objectif est de  $2 \cdot 10^{30}$  photons. $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . La probabilité d'absorption à deux photons par notre chromophore durant une impulsion est de  $2 \cdot 10^{-8}$ , en 1 seconde il y a eu  $10^8$  impulsions, donc 2 absorptions. Si nous considérons le cas d'un laser continu, délivrant 10 mW en continu à la même longueur d'onde, en 1 seconde il y aura eu  $2 \cdot 10^{-2}$  absorptions.

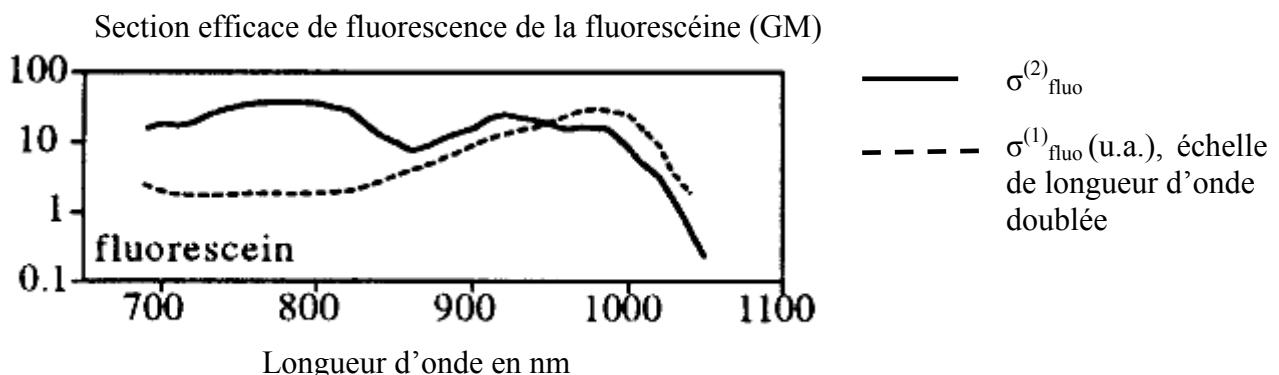
Les ordres de grandeur de  $\sigma^{(2)}$  pour deux colorants très répandus : la rhodamine B et la fluorescéine sont donnés au tableau I)A.1 [Xu, 1996a] :

Marqueurs	Longueur d'onde du maximum de la section efficace (nm)	$\sigma^{(2)}$ (GM)
Rhodamine B	840	$210 \pm 60$
Fluorescéine pH=11	780	$36 \pm 15$

**Tableau I)A.1 :** sections efficaces d'absorption à deux photons de la rhodamine B et de la fluorescéine à pH=11.

La figure I)A.2 présente les valeurs de  $\sigma^{(2)}$  et  $\sigma^{(1)}$  (au facteur de rendement quantique près, défini dans le paragraphe suivant) pour la fluorescéine en fonction de la longueur d'onde du rayonnement exciteur.

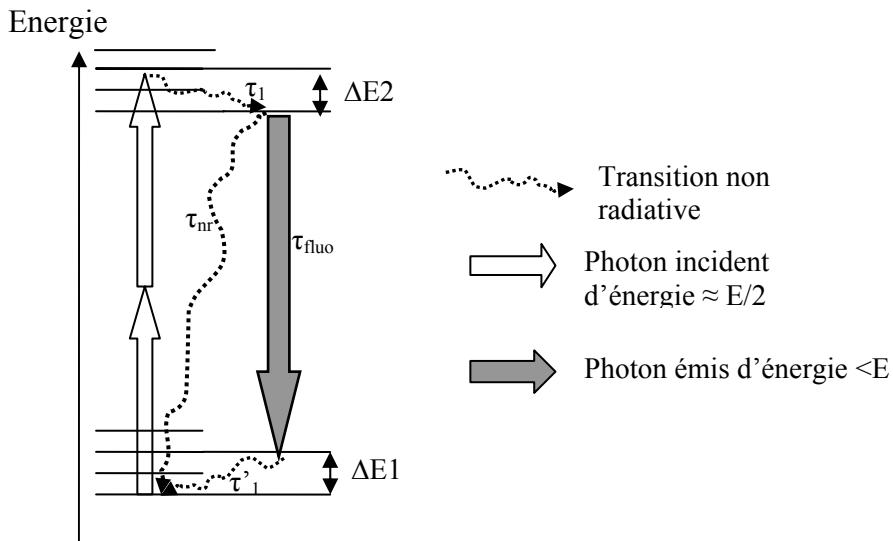
La courbe représentant  $\sigma^{(1)}$  possède une échelle en abscisse multipliée par un facteur 2 afin de pouvoir comparer ses valeurs avec celles de  $\sigma^{(2)}$ . Les positions des maxima de  $\sigma^{(2)}$  ne correspondent pas à ceux de  $\sigma^{(1)}$ . De plus, de nouveaux pics apparaissent pour  $\sigma^{(2)}$ . Ces différences s'expliquent par le fait que les règles de sélection des transitions sont différentes pour l'absorption à un ou à deux photons.



**Figure I)A.2 :** section efficace de fluorescence de la fluorescéine à pH=13 exprimée en GM (pour  $\sigma^{(2)}$ ) en fonction de la longueur d'onde du rayonnement incident. La courbe en trait plein correspond à la fluorescence à 2 photons, en trait pointillé à 1 photon (échelle de longueur d'onde doublée pour comparaison). D'après Xu et al. (PNAS Vol.93, pp.10763-10768, Octobre 1996).

- Fluorescence :

Considérons un fluorophore non plus comme un simple dipôle, mais comme ayant une certaine structure et donc des degrés de libertés supplémentaires. Alors, les états  $|e\rangle$  et  $|f\rangle$  sont remplacés par de nombreux états rotationnels et vibrationnels (Figure I)A.3). La différence d'énergie entre la somme des deux photons d'excitation et celui de désexcitation ou de fluorescence est appelé le décalage de Stokes (*Stokes shift*). Il vaut  $\Delta E$  avec  $\Delta E = \Delta E_1 + \Delta E_2$ , cette énergie se retrouvant sous forme de transfert thermique dans le milieu. (Il vaut 30 nm pour la fluorescéine à pH 13 et une excitation à 500 nm à un photon).



**Figure I.A.3 :** schéma des transitions impliquées dans le phénomène de fluorescence excitée à deux photons. Le décalage de Stokes correspond à la somme de  $\Delta E_1$  et  $\Delta E_2$ .

Avant l'émission du photon de fluorescence le système connaît une désexcitation qui peut être une relaxation thermique par transfert d'énergie vers des modes de vibration ou de rotation d'énergie proche. Ce transfert se fait avec un temps caractéristique court  $\tau_1$  devant le temps  $\tau_{\text{flu}}$  mis avant d'émettre un photon de fluorescence. Le système peut se désexciter également de façon non radiative avec le temps caractéristique  $\tau_{\text{nr}}$ . Les taux de désexcitation par fluorescence et par transfert non radiatif valent respectivement :  $1/\tau_{\text{flu}}$  et  $1/\tau_{\text{nr}}$ . Le taux de désexcitation de l'état excité vaut donc  $1/\tau_{e \rightarrow f} = 1/\tau_{\text{flu}} + 1/\tau_{\text{nr}}$ , la probabilité d'émettre un photon lors de la désexcitation est donc :

$$\eta = \frac{\tau_{e \rightarrow f}}{\tau_{\text{flu}}} = \frac{1}{1 + \frac{\tau_{\text{flu}}}{\tau_{\text{nr}}}} \quad (\text{I.A-9}).$$

$\eta$  est aussi appelé rendement quantique de fluorescence. Pour la fluorescéine  $\eta$  prend la valeur moyenne sur tout le spectre de 0,9 [Xu, 1996b].

La mesure de  $\tau_{e \rightarrow f}$  peut s'effectuer directement dans le domaine temporel par une méthode pompe sonde [Brant, 1971], en promouvant une population de molécules dans l'état excité par une impulsion de pompe, et en sondant l'absorption par une impulsion sonde avec un retard variable. Cette étude de l'évolution temporelle du nombre de molécules dans l'état excité,

permet d'en déduire  $\tau_{e \rightarrow f}$  d'une valeur typique de :  $10^{-9}$  s. D'autres méthodes peuvent s'effectuer dans le domaine fréquentiel [Weber, 1969] ; [Lakowicz, 1982] ; [Lakowicz, 1983]. L'expression I.A-9 permet de définir la section efficace de fluorescence excitée à deux photons  $\sigma_{fluo}^{(2)} = \eta \cdot \sigma^{(2)}$  où  $\sigma^{(2)}$  désigne la section efficace d'absorption à 2 photons introduite précédemment. La puissance (en photons/s) émise par rayonnement de fluorescence excitée à deux photons vaut à partir de l'intensité exprimée en photons/s/cm<sup>2</sup> :

$$P = \frac{1}{2} N \eta \sigma^{(2)} I^2(\omega) = \frac{1}{2} N \sigma_{fluo}^{(2)} I^2(\omega) \quad (\text{I.A -10}).$$

Le rayonnement de fluorescence est isotrope, et n'est pas cohérent avec l'excitation. Cette incohérence se retrouve dans la dépendance linéaire de la puissance rayonnée avec le nombre de fluorophores N.

Le rendement quantique de fluorescence est variable. Il vaut par exemple 0,9 sur tout le spectre pour la fluorescéine. Un autre colorant répandu comme l'Indo-1 non complexé peut avoir un rendement de 0,38 [Xu, 1996a].

Le paramètre à étudier pour le choix d'un colorant de fluorescence est donc le produit  $\eta \cdot \sigma^{(2)}$ . Il s'agit d'ailleurs de la valeur à laquelle nous aurons accès lors de nos expériences décrites dans la partie A du chapitre II, et au chapitre III.

- Saturation :

Il est possible d'estimer la puissance pour laquelle l'absorption à deux photons est à la limite de saturation. Lorsque la saturation de l'absorption est atteinte, si la puissance incidente augmente, la puissance absorbée restera constante. Cette limite correspond à une probabilité d'absorption à deux photons (expression I.A-6) de valeur unitaire. Cette saturation se traduit par les relations [Xu, 1996b]:

$$\Delta t \cdot \sigma_{fluo}^{(2)} \frac{I_c^2}{\hbar^2 \omega^2} \approx 1 \quad (\text{I.A-11})$$

$$I_c \approx \frac{\hbar\omega}{\sqrt{\sigma_{fluo}^{(2)} \Delta t}} \quad (\text{I.A-12}).$$

$\Delta t$  correspondant à la largeur temporelle de l'impulsion du laser incident d'intensité crête :  $I_c$ . Dans l'équation IA-11, la section efficace s'exprime en  $\text{cm}^4(\text{photon/sec})^{-1}$ , l'intensité en Watt/cm<sup>2</sup>. Ecrivons, dans la limite de diffraction, la puissance moyenne  $P_m$  au foyer d'un objectif d'ouverture numérique O.N. (l'expression II.C-2 fournit le diamètre de la surface couverte par la faisceau incident au foyer de l'objectif), une fréquence de répétition des impulsions  $f$ , de durée  $\Delta t$ , à une longueur d'onde moyenne  $\lambda$  :

$$P_m = \frac{\pi \cdot (0,2)^2 \lambda^2 f \Delta t I_c}{O.N.^2} \quad (\text{I.A-13}).$$

On en déduit la puissance de saturation :

$$P_{m sat} = \frac{\pi (0,2)^2 \lambda \cdot f \cdot h.c. (\Delta t)^{1/2}}{O.N.^2 \sqrt{\sigma_{fluo}^{(2)}}} \quad (\text{I.A-14}).$$

Pour des impulsions de  $\Delta t=100$  fs avec  $f=80$  MHz,  $\lambda=1,0$  μm et  $O.N.=1.3$  on obtient une puissance moyenne de saturation  $P_{msat}$  de 10 mW pour une section efficace d'1GM ( $10^{-50}$  cm<sup>4</sup>(photon/s)<sup>-1</sup>). Dans les expériences de mesures de section efficace, il faudra donc se placer en dehors de la limite de saturation. Il faudra utiliser une puissance incidente telle que la puissance absorbée varie linéairement avec le carré celle-ci. Pratiquement, une zone de linéarité peut être trouvée au voisinage de  $P_{msat}/3$ .

### iii. Génération de second harmonique

- Définition :

A la différence de la fluorescence la génération de second harmonique (SHG) est un phénomène cohérent, c'est-à-dire que le signal généré possède une phase non aléatoire, corrélée avec l'excitation. Les champs harmoniques rayonnés par différents centres émetteurs

pourront alors interférer entre eux. Cette cohérence en SHG n'est possible que s'il n'y a pas d'absorption du rayonnement incident puis réémission, comme dans le cas de la fluorescence. Le moment dipolaire à la pulsation  $2\omega$  pour une excitation à  $\omega$ , dépend de l'hyperpolarisabilité d'ordre 1 :  $\beta$  dans l'équation I.A-1.

$$\underline{p}(2\omega) = \frac{1}{2} \beta \underline{E}(\omega) \cdot \underline{E}(\omega) \quad (\text{I.A-15}).$$

Si l'on suppose le champ électrique polarisé suivant une direction Oz, que le chromophore ne possède qu'un moment dipolaire suivant z et que celui-ci est orienté dans la même direction que le champ, la formule I.A-16 devient :

$$p_z(2\omega) = \frac{1}{2} \beta_{zzz} E_z^2(\omega) \quad (\text{I.A-16}).$$

La puissance rayonnée  $P$  à  $2\omega$  (en nombre de photons) par un harmonophore est (l'intensité  $I$  correspond au flux de photons en photons/s/cm<sup>2</sup>) [Moreaux, 2000]:

$$P = \frac{1}{2} \frac{4n_{2\omega} \hbar \omega^5}{3\pi n_\omega^2 \epsilon_0 c^5} |\beta|^2 I^2(\omega) \quad (\text{I.A-17}).$$

On retrouve dans cette dernière expression le caractère non linéaire de la génération de second harmonique, du fait de la dépendance de la puissance avec le carré de l'intensité. La dépendance avec la puissance cinquième de l'intensité provient des unités employées en nombres de photons et non en Joule. Il est possible de définir une section efficace  $\sigma_{\text{SHG}}^{(2)}$  pour la SHG :

$$P = \frac{1}{2} \sigma_{\text{SHG}}^{(2)} I^2(\omega) \quad (\text{I.A-18}).$$

$$\sigma_{\text{SHG}}^{(2)} = \frac{4n_{2\omega} \hbar \omega^5}{3\pi n_\omega^2 \epsilon_0 c^5} |\beta|^2 \quad (\text{I.A-19}).$$

Le processus étant cohérent, il convient d'ajouter les composantes des champs électriques rayonnés par chaque dipôle. Il faut tenir compte des déphasages introduits par la distribution spatiale des dipôles. On peut montrer, par exemple, que des dipôles alignés suivant la polarisation du faisceau incident, rayonnent une puissance proportionnelle au carré de la densité volumique d'harmonophores. Le signal de second harmonique à la différence de celui de fluorescence n'est pas isotrope, la SHG se fait dans l'exemple précédent dans des directions bien précises (diagramme d'antennes), [Moreaux, 2000], [Mertz, 2001].

La puissance rayonnée par une assemblée d'harmonophores à partir de I.A-18 est obtenue suite à un moyennage spatial des composantes tensorielles des hyperpolarisabilités. Un milieu homogène peut être invariant par une symétrie centrale, il est dit : « centrosymétrique », c'est le cas par exemple d'un liquide ou d'un gaz composés de molécules achirales. Dans un milieu centrosymétrique, les susceptibilités d'ordre pair sont nulles, il ne peut pas y avoir d'effets non linéaires d'ordre 2 dans un tel milieu, donc pas de génération de second harmonique.

Par contre, dans le cas d'une surface cette invariance est brisée. Il est alors possible de produire un signal de second harmonique. Ce signal est même extrêmement sensible à l'organisation de la surface à l'échelle moléculaire [Heinz, 1991], [Shen, 1989].

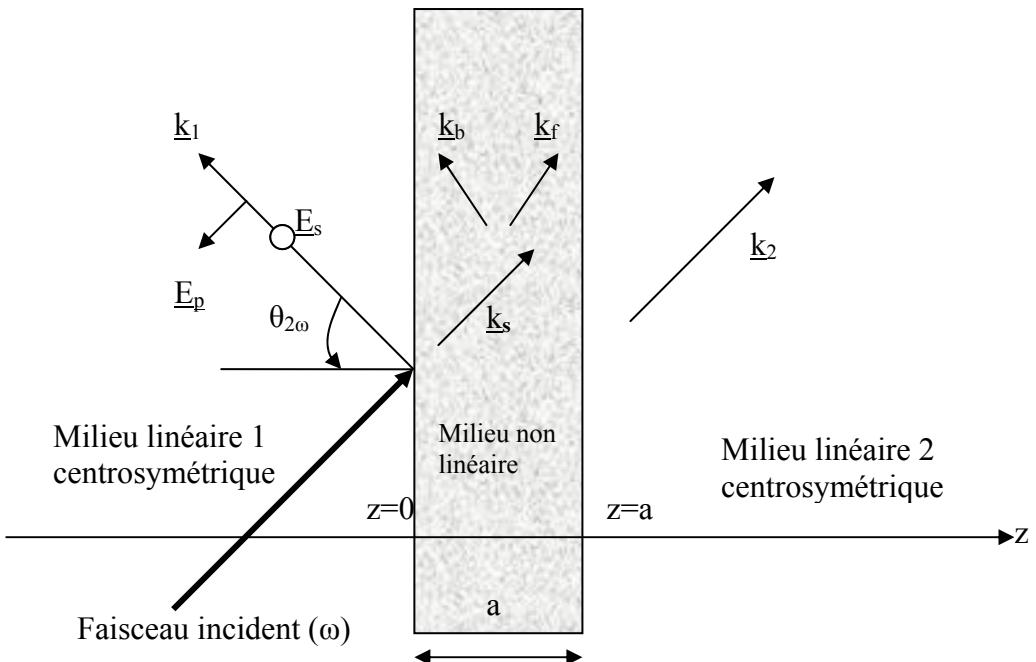
- SHG de surface :

L'utilisation de l'optique non linéaire pour sonder des surfaces est une méthode d'investigation très riche. Sa sensibilité est spécifique de la surface sondée. La mesure du signal de SHG réfléchi par la surface et résolu en polarisation fournira des informations sur les propriétés optiques non linéaires des molécules sondées et leur organisation à la surface.

- Calcul de l'intensité du signal de SHG réfléchi :

Considérons une couche d'épaisseur  $a$ , écrivons l'intensité du signal de second harmonique généré par la surface.

La géométrie est décrite sur la figure I.A.4 :



**Figure I)A.4 : géométrie de la génération de second harmonique réfléchi.**

Les ondes à la pulsation  $2\omega$  ont les vecteurs d'onde :

- $2\underline{k}_{\text{monocouche}}(\omega) = \underline{k}_s$  pour l'onde forcée dans la monocouche
- $\underline{k}_b$  et  $\underline{k}_f$  pour les ondes libres dans la monocouche
- $\underline{k}_1$  et  $\underline{k}_2$  pour les ondes libres respectivement réfléchies et transmises par la monocouche

On travaille dans l'approximation d'une couche mince c'est-à-dire  $k(\omega).a$  très petit devant 1.

On définit une densité surfacique de polarisation  $\underline{P}^{\text{NL}}$  sur l'épaisseur de la monocouche par :  $\underline{P}^{\text{NS}} = a \cdot \underline{P}^{\text{NL}}$ , où  $\underline{P}^{\text{NS}}$  désigne la polarisation non linéaire d'ordre 2 engendrée par tout le volume de la monocouche.

Les milieux linéaires 1 et 2 sont centrosymétriques, ils ne donnent aucune contribution dipolaire électrique au signal de SHG. Par contre, il est possible d'avoir des contributions quadrupolaires électriques et dipolaires magnétiques.

La susceptibilité d'ordre 2 surfacique  $\chi_{(s)}^{(2)}$  est d'origine dipolaire électrique. Il existe d'autres contributions liées à la discontinuité du champ incident à la surface qui seront négligées ici. [Guyot-Sionnest, 1986], [Guyot-Sionnest, 1988], [Shen, 1989].

A partir des conditions de passage aux interfaces en  $z=a$  et  $z=0$  (les composantes de  $E$  et  $H$ (champ magnétique) parallèles à la surface sont continues à sa traversée en l'absence de charge et de courant libres surfaciques) on obtient les composantes du champ électrique réfléchi à  $2\omega$  suivant la direction  $s$  normale au plan d'incidence et la direction  $p$  (parallèle au plan d'incidence) :

$$E_s(2\omega) = \frac{16\pi i\omega^2}{c^2(k_{1z} + k_{2z})} P_y^{NS}(2\omega) \quad (\text{I.A-20})$$

$$E_p(2\omega) = \frac{16\pi i k_1 \omega^2}{c^2(k_2^2 k_{1z} + k_1^2 k_{2z})} (k_{2x} P_z^{NS}(2\omega) + k_{2z} P_x^{NS}(2\omega)) \quad (\text{I.A-21})$$

$$\underline{P}^{NS}(2\omega) = \underline{\underline{\chi}}_{(s)}^{(2)}(\omega, \omega) \underline{E}_{loc}(\omega) \underline{E}_{loc}(\omega) \quad (\text{I.A-22})$$

Avec  $\underline{E}_{loc}$  le champ électrique local dans la monocouche.

Ce qui nous permet d'écrire l'intensité correspondante [Shen, 1989]:

$$I(2\omega) = \frac{32\pi^3 \omega^2 \sec^2 \theta_{2\omega}}{c^3 \epsilon_1^{1/2}(2\omega) \epsilon_1(\omega)} \left| \underline{e}'^+(2\omega) \cdot \underline{\chi}_s^{(2)}(\omega, \omega) \cdot \underline{e}'(\omega) \right|^2 I_1^2(\omega) \quad (\text{I.A-23})$$

Avec  $\underline{e}'(\omega) = \underline{F} \underline{e}(\omega)$  où  $F$  désigne la matrice de transmission faisant intervenir les coefficients de Fresnel pour la traversée d'une interface entre le milieu linéaire et le milieu non linéaire,  $\underline{e}(\omega)$  le vecteur unitaire suivant le champ électrique incident à  $\omega$ .  $\underline{e}'^+(2\omega)$  désigne le vecteur unitaire suivant le champ réfléchi à  $2\omega$ .  $\epsilon_1$  correspond à la permittivité du milieu linéaire.

- Aspects tensoriels :

Pour une surface invariante pour les groupes de symétrie  $C_4$ ,  $C_6$ ,  $C_\infty$  les composantes non nulles de la susceptibilité d'ordre 2 surfaciques sont (pour la SHG où n'intervient qu'une seule fréquence) :

$$\chi_{(s)zzz}, \chi_{(s)xxz} = \chi_{(s)xzx} = \chi_{(s)yzy} = \chi_{(s)yyz}, \chi_{(s)zxx} = \chi_{(s)zyy}, \chi_{(s)xyz} = \chi_{(s)xzy} = -\chi_{(s)yxz} = -\chi_{(s)yzx}$$

où  $\underline{u}_z$  désigne un vecteur suivant la direction normale à la surface considérée, et  $\underline{u}_x$  et  $\underline{u}_y$  correspondent à deux vecteurs unitaires orthogonaux entre eux, parallèles à la surface [Giordmaine, 1965].

Dans le cas où une symétrie plane laisse la surface invariante (cas de molécules achirales par exemple) les groupes de symétrie intervenant dans le système sont  $C_{4v}$ ,  $C_{6v}$ ,  $C_{\infty v}$ . Les composantes non nulles :

$$\chi_{(s)zzz}, \chi_{(s)xxz} = \chi_{(s)xzx} = \chi_{(s)yzy} = \chi_{(s)yyz}, \chi_{(s)zxx} = \chi_{(s)zyy}$$

Il est impossible de générer un signal de second harmonique sur une surface isotrope en incidence normale. Le champ électrique incident est dans le plan ( $xoy$ ) ; pour que la polarisation à  $2\omega$  soit non nulle, il faudrait une composante tensorielle avec uniquement  $x$  ou  $y$  différente de zéro.

- Monocouche adsorbée sur une surface :

Dans le cas d'une monocouche adhérente sur une surface, il convient d'effectuer une moyenne suivant toutes les orientations possibles de l'hyperpolarisabilité  $\beta$  de la molécule afin d'obtenir la susceptibilité d'ordre 2. Cette moyenne doit être compatible avec les liaisons existantes entre les molécules et la surface. Si toutes les molécules se fixent sur la surface avec les mêmes liaisons, il existe une certaine organisation sur la surface. Ceci limite le nombre d'orientations sur lequel il faut effectuer le moyennage. On obtiendra une expression du type :

$$\chi_{(s)}^{(2)} = N_s \langle \beta \rangle_{\text{orientations compatibles}} \quad (\text{I.A-24})$$

$N_s$  correspond à la densité surfacique de molécules adsorbées. Pour une représentation plus fiable, le calcul de  $\beta$  peut tenir compte des interactions nouvelles pouvant exister entre le substrat et les molécules. La rugosité de la surface peut aussi apporter une exaltation du champ. La formule I.A-24 est valable du moment que les interactions entre molécules peuvent être négligées (densité  $N_s$  suffisamment petite pour que les molécules soient assez loin les unes des autres), dans le cas contraire, la somme des composantes individuelles ne correspondra à la susceptibilité qu'en première approximation.

De façon très générale, lorsque des molécules sont déposées sur un substrat possédant un certain volume,  $\chi_{(S)}^{(2)}$  peut s'écrire sous la forme [Shen, 1989]:

$$\chi_{(S)}^{(2)} = \chi_{SubS}^{(2)} + \chi_{mol}^{(2)} + \chi_{int}^{(2)} \quad (\text{I.A-25}).$$

où  $\chi_{SubS}^{(2)}$  provient de la surface du substrat seul,  $\chi_{mol}^{(2)}$  correspond à la couche de molécules adsorbées et  $\chi_{int}^{(2)}$  à l'interaction entre ces molécules et le substrat. Le premier terme peut être identifié en procédant à une analyse de la polarimétrie du signal de SHG généré par un substrat nu. Ce terme peut donc ensuite être soustrait.

- Remarques :

Si les molécules peuvent s'orienter de façon totalement aléatoire sur la surface, alors,  $\chi_{(S)}^{(2)}$  devient nul (même dans le cas de molécules chirales, voir partie B).

Il est possible d'écrire la composante  $ijk$  du tenseur susceptibilité d'ordre 2, résultant d'un moyennage ( $av$ ) de l'hyperpolarisabilité  $\beta$  sur toutes les directions de l'espace, on obtient alors l'expression I.A-4 [Heinz, 1983] :

$$\chi_{(S)ijk}^{(2)} = N_S \left\langle (\underline{I.i})(\underline{J.j})(\underline{K.k}) \right\rangle_{av} \beta_{IJK}^{(2)} \quad (\text{I.A-26}).$$

Les indices  $I, J$  et  $K$  correspondent aux coordonnées dans le repère de la molécule et  $i, j$  et  $k$  à celles dans le repère du laboratoire. Une application possible, est la détermination des orientations moléculaires sur la surface lorsque  $\beta$  est assez simple (ne comporte que quelques composantes non nulles). Connaissant  $\chi_{(S)}^{(2)}$ ,  $N_S$  et  $\beta$ , il est possible de remonter à  $\left\langle (\underline{I.i})(\underline{J.j})(\underline{K.k}) \right\rangle$ , donc à l'orientation des molécules dans le repère du laboratoire.

- Ordre de grandeur :

Pour une couche de molécules polaires adsorbées sur une surface on trouve un  $\chi_{(S)}^{(2)}$  de l'ordre de  $10^{-15}$  e.s.u En prenant pour l'intensité incidente  $I_1(\omega) : 10 \text{ MW/cm}^2$ , une surface irradiée de  $0,2 \text{ cm}^2$ , des impulsions de  $10 \text{ ns}$ , un angle  $\theta_{2\omega}$  de  $45^\circ$ , on attend  $10^4$  photons/impulsion à  $2\omega$ .

Nous traiterons dans la partie B de ce chapitre un exemple de calcul de susceptibilité, à partir de l'hyperpolarisabilité du colorant ASTB déposé sur une surface. Nous verrons au troisième chapitre comment des expériences de surface peuvent nous guider dans la conception de nouveaux colorants pour l'imagerie non linéaire.

#### iv. Utilisation de la SHG et TPEF en microscopie non linéaire

- Obtention des images :

La SHG et de la TPEF sont des processus qui peuvent être utilisés en microscopie à balayage [Webb, 1990]. Nous avons vu que les puissances rayonnées par ces processus sont proportionnelles à l'intensité incidente au carré. Une optique focalisatrice permet d'augmenter l'intensité d'un faisceau incident et les signaux de TPEF et SHG générés ne seront significatifs qu'au voisinage du foyer image de l'objectif ou de la lentille utilisés. Ils permettent donc d'exciter sélectivement une zone restreinte de l'espace située au voisinage du foyer de l'élément utilisé. La dépendance quadratique des signaux avec l'intensité incidente permet une sélectivité spatiale accrue par rapport au cas linéaire. Cela procure une résolution tridimensionnelle intrinsèque sans l'utilisation de filtre spatial.

Dans le plan focal, il est possible d'obtenir une image point par point de l'échantillon, en balayant le faisceau incident en entrée de l'objectif. Avec l'utilisation de différents filtres chromatiques les signaux de SHG et de TPEF peuvent être collectés séparément. En faisant varier la distance entre l'objectif et l'échantillon, il est ensuite possible d'imager les objets en volume.

Pour les deux modes d'imagerie TPEF et SHG, l'utilisation des lasers pulsés femtoseconde est nécessaire. En effet, nous avons vu qu'il fallait utiliser des intensités instantanées importantes pour générer des effets non linéaires, l'utilisation d'une puissance incidente de l'ordre de  $10^5$  W fournie en continu serait destructrice pour l'échantillon.

- Origines des signaux de SHG et de TPEF :

La SHG comme la TPEF permettent d'imager la répartition de certains composés présents naturellement dans les tissus qui fournissent un contraste endogène. Il est également possible d'introduire de façon exogène un marquage de certaines structures, en utilisant soit des colorants (chromophores organiques, nanoparticules,..) soit en induisant l'expression de protéines fluorescentes par modification génétique des cellules.

Dans la microscopie par marquage exogène, des colorants synthétisés pour une efficacité optimale en SHG ou TPEF vont cibler avec des zones spécifiques de l'échantillon. Les colorants conçus initialement pour la microscopie linéaire de fluorescence peuvent être généralement utilisés en TPEF. Les colorants de SHG sont, eux, beaucoup moins nombreux. Ces colorants lorsqu'ils sont optimisés pour se fixer dans les membranes cellulaires permettent d'imager spécifiquement ces zones. La compréhension des mécanismes mis en jeu est alors identique à celle intervenant dans la SHG générée en surface décrite précédemment. Les colorants permettent, par exemple, de localiser des composés en se fixant spécifiquement sur ceux-ci. Ils fournissent alors un contraste spécifique de leur substrat, et permettent des études quantitatives d'évolutions temporelles ou de distributions spatiales (en volume). Par exemple, certains chromophores injectés dans la cellule ont un rendement quantique de fluorescence qui dépend de la concentration intracellulaire d'un ion particulier. D'autres colorants membranaires seront spécifiques d'un phospholipide particulier présent dans la membrane, etc...

Les mécanismes de contrastes en SHG et en TPEF sont différents. Le signal de SHG ne peut provenir que de milieux non centrosymétriques, il ne peut pas être généré dans un liquide. Ce n'est pas le cas en TPEF où le signal provient à la fois des cellules et du bain extérieur. Après un marquage membranaire, il n'est pas utile de rincer la préparation pour une observation en SHG car il n'y a pas de signal provenant du bain.

- Comparaison SHG/TPEF :

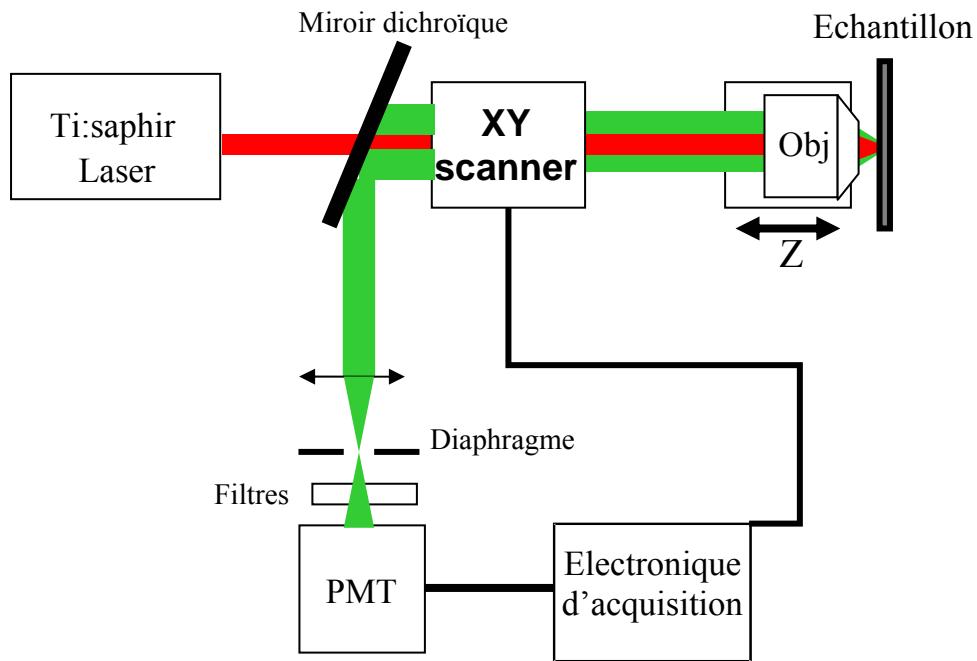
Les colorants actuellement optimisés pour la microscopie de SHG (Di-6-Anneps), possèdent une section efficace de SHG de 4 ordres de grandeur inférieure à celle de TPEF [Moreaux, 2000]. Cependant, la puissance rayonnée en SHG varie comme le carré de la concentration volumique en marqueurs, alors que celle rayonnée en TPEF lui est seulement proportionnelle. Ainsi, l'imagerie membranaire de second harmonique est rendue possible si la densité de marqueurs est suffisante dans la membrane.

Une différence essentielle entre la SHG et la TPEF est que la SHG n'implique pas de processus d'absorption par les cellules. Ainsi, elle permet de réduire les effets délétères liés à la déposition d'énergie dans le milieu : photosensibilisation, photoblanchissement, échauffement, etc.

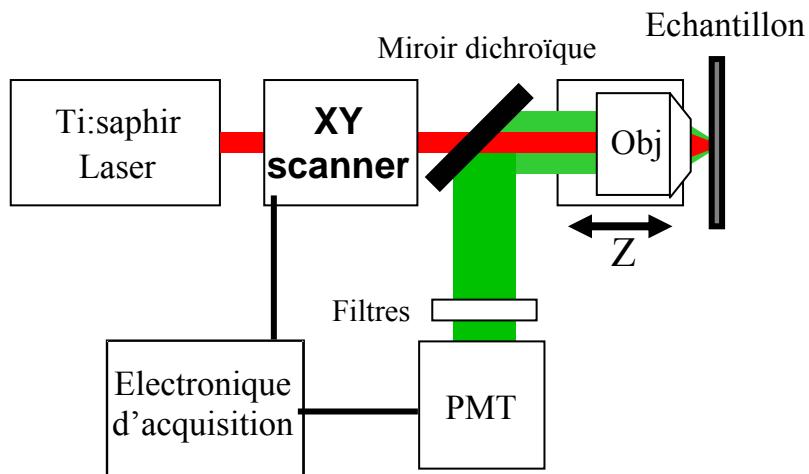
- Comparaison microscopie non linéaire/microscopie de fluorescence :

Dans le microscope confocal à balayage (figure I.A.6), l'image de fluorescence (excitée linéairement) est obtenue point par point et un scanner balaye le faisceau incident en entrée de l'objectif. Le signal de fluorescence rétro émis est collecté par l'objectif, il traverse ensuite le scanner, et est réfléchi par un miroir dichroïque. L'utilisation d'un miroir dichroïque est possible parce que le rayonnement incident et celui de fluorescence sont dans des plages spectrales différentes. Une lentille convergente focalise le signal de fluorescence sur un diaphragme qui est le conjugué du foyer image de l'objectif par le miroir dichroïque. Ainsi, une sélection spatiale du signal de fluorescence issu seulement du foyer de l'objectif a lieu.

Dans le microscope à balayage en TPEF ou SHG (Figure I.A.7), il n'est plus besoin d'utiliser un diaphragme afin d'assurer la sélectivité spatiale du signal. L'effet non linéaire n'étant significatif qu'au voisinage du foyer de l'objectif, tout signal de SHG ou de TPEF ne pourra provenir que de ce point.



**Figure I.A.6 :** schéma de principe de fonctionnement du microscope confocal.



**Figure I.A.7 :** schéma de principe de fonctionnement du microscope non linéaire à balayage. Le faisceau issu d'un laser fémtoseconde est balayé via un scanner permettant ainsi d'exciter l'échantillon point par point dans le plan focal de l'objectif. Une partie de la lumière émise vers l'arrière peut être collectée par l'objectif puis filtrée avant de parvenir au photomultiplicateur (PMT).

La microscopie non linéaire possède au moins trois avantages essentiels par rapport à la microscopie confocale :

(1) Les échanges d'énergie entre la lumière incidente sortant de l'objectif et le milieu sont différents suivant le type de microscopie. En microscopie non linéaire, il n'y a pas d'absorption en dehors du plan focal donc aucun dépôt d'énergie dans les plans de cette zone. Par contre, en microscopie confocale chaque plan du cône de focalisation absorbe la même quantité énergie, ce qui implique une plus grande phototoxicité.

(2) En microscopie non linéaire, il est possible de réaliser de l'imagerie des tissus en profondeur tout en maintenant une résolution subcellulaire. Le signal généré au foyer de l'objectif pourra être détecté même s'il fortement diffusé par le tissu, la collection de la lumière ne nécessitant pas de filtrage spatial. De plus, les longueurs d'onde proche infra rouge utilisées en microscopie non linéaire sont peu diffusées ce qui contribue également à la capacité de maintenir un volume d'excitation micrométrique en profondeur, [Oheim, 2001]. Par contre, il est plus difficile d'imager des zones profondes de l'échantillon en microscopie confocale. La fluorescence générée en dehors du point focal est diffusée et sa réjection par le filtre spatial est imparfaite. Elle est alors détectée et détériore le rapport signal sur bruit des images en profondeur. De plus, la fluorescence générée au foyer sera diffusée par l'échantillon avant d'atteindre le diaphragme placé devant le détecteur. Le rapport signal sur bruit s'en trouvera d'autant plus dégradé que l'on cherche à imager une zone profonde de l'échantillon.

(3) La dernière raison est que la microscopie non linéaire, permet de nouveaux modes de contraste comme la SHG et permet d'accéder à des informations inaccessibles en microscopie non linéaire.

Nous détaillerons dans la partie D du chapitre II le microscope à balayage utilisé. Des applications d'utilisation de ces techniques seront présentées aux chapitres III et IV.

## I) B. Activité optique

Dans cette partie, un rappel nous permettra de présenter l'activité optique en régime linéaire (i). Ce sera l'occasion d'introduire le formalisme général d'une interaction non locale entre le champ et la matière. L'extension de ce formalisme au régime non linéaire fera l'objet du point (ii). Nous pourrons mettre à profit ce travail pour décrire au (iii), le signal de second harmonique généré par une surface de molécules chirales. Nous montrerons alors quelles sont les expériences de polarimétrie pertinentes à mener. Nous verrons enfin en (iv) que l'introduction de deux modèles phénoménologiques, nous permet de mieux cerner l'origine de la chiralité moléculaire. Nous verrons surtout quelles sont les prédictions de ces modèles quant aux mesures polarimétriques introduites précédemment.

L'activité optique est l'effet produit par une espèce chimique sur la polarisation de la lumière qui interagit avec elle. La propriété qu'ont certaines substances (fluides ou solides) de faire tourner le plan de polarisation d'une onde polarisée rectilignement qui les traverse [Perez, 1994] est appelée : rotation optique. Lorsque le milieu absorbe différemment deux ondes polarisées circulairement droite et gauche, il s'agit du dichroïsme circulaire (découverte par Haidinger en 1848). La rotation optique a été découverte en 1811 par D. Arago sur le quartz ( $\text{SiO}_2$ ) et par J.B. Biot sur l'essence de térébentine ( $\text{C}_{10}\text{H}_6$ ) [Biot, 1844]. Par exemple, une cuve de 10 cm de longueur contenant une solution aqueuse de glucose à la concentration de 1 g/cm<sup>3</sup> à 20 °C fera tourner de 53 ° le plan de polarisation d'une lumière incidente polarisée rectilignement. Une cuve remplie d'eau dans les mêmes conditions n'aura aucun effet sur la polarisation. A cette propriété nous associons un pouvoir rotatoire spécifique d'une molécule  $[\alpha^\circ]$  (en °.cm<sup>2</sup>/g), qui ne dépend pas de sa concentration (en g/cm<sup>3</sup>), ni de la longueur  $l$  de la cuve (en dm) traversée par la lumière, mais ce pouvoir dépendra de la longueur  $\lambda$  d'onde du rayonnement incident et de la température  $T$ .

$$\alpha = [\alpha^\circ]_{\lambda,T} \cdot c \cdot l \quad (\text{I.B-1}).$$

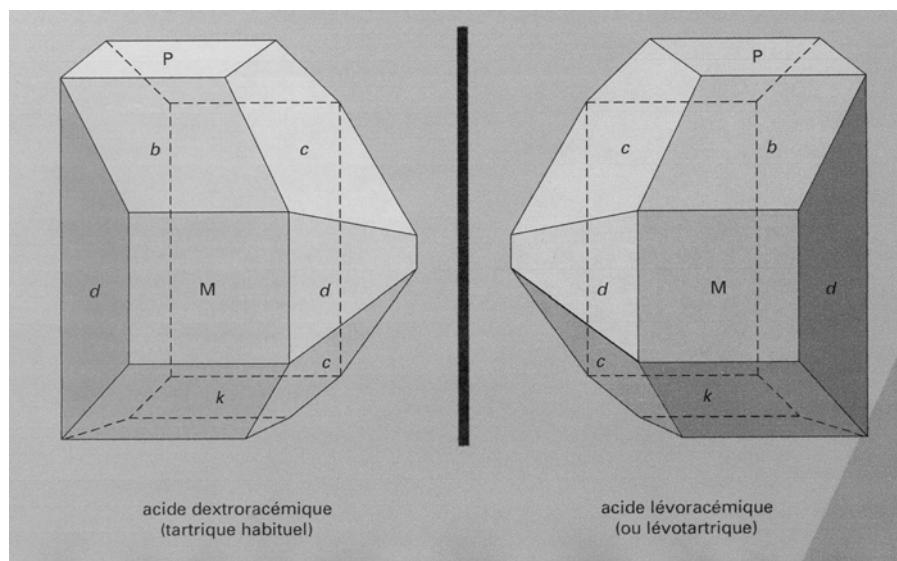
Le glucose est une molécule chirale (du grec *kheir* signifiant main) : lorsque l'on forme l'image de cette molécule dans un miroir, elle n'est pas superposable à la molécule originale (comme les deux mains d'un individu). Il s'agit d'une propriété commune à toute molécule ou

arrangement de molécules ou d'ions qui exhibent une activité optique. La relation existant entre deux molécules images l'une de l'autre dans un miroir s'appelle une relation d'énanthiométrie, et chaque configuration s'appelle un énanthiomère.

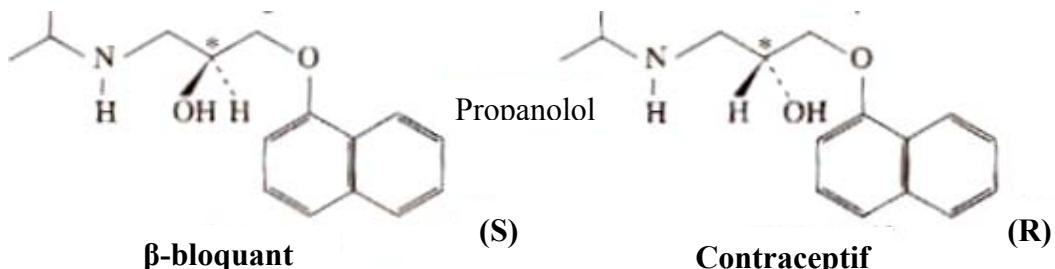
Deux énanthiomères ont les mêmes propriétés physiques : température de fusion, produit de solubilité, etc,...sauf vis-à-vis de la lumière polarisée. Entre 1848 et 1851 Pasteur (1822-1895) fit d'importantes découvertes en stéréochimie. Il parvint à séparer par triage manuel des cristaux de tartrate double de sodium et d'ammonium de chiralité opposée ( $\text{Na}^+\text{OOC-C*HOH-C*HOH-COO}^-\text{NH}_4^+$ , la figure I)A.1 représente les deux formes cristallines de l'acide tartrique). Il attribua l'activité optique de l'acide tartrique (provenant du tartre déposé dans les fûts de chêne contenant du vin et présent sous une seule forme énanthiomérique) à la chiralité moléculaire et pas uniquement à la dissymétrie des cristaux qui lui avait permis de les séparer [Pasteur, 1853].

Biologie et stéréochimie n'ont pas pour seul trait d'union Louis Pasteur. En effet, bon nombre des molécules du vivant ne sont présentes que sous un seul énanthiomère. Une infinité d'exemples pourrait être citée, les plus connus d'entre eux sont : les sucres (glucose, sucrose, arabinose), l'acide désoxyribonucléique en double hélice, les protéines où des acides aminés sont chiraux, les collagènes en triple hélice, etc.

L'importance de la chiralité en biologie peut être illustrée par l'exemple du propanolol (figure I)A.2) [Lhoste, 2002] où une configuration est un contraceptif et où l'autre énanthiomère est un  $\beta$ -bloquant (les sites  $\beta$  sont des sites récepteurs d'hormones, comme l'adrénaline, agissant comme simulateur cardiaque ; en se fixant à la place de l'adrénaline un  $\beta$ -bloquant s'oppose à son action). La majeure partie des réactions enzymatiques en biologie est spécifique d'un enzyme et plus précisément d'une seule configuration de cet enzyme.



**Figure I)A.1 :** deux formes images l'une de l'autre dans un miroir de cristaux d'acide tartrique, les deux formes supramoléculaires ne sont pas superposables.



**Figure I)A.2 :** deux formes énantiomériques du propanolol, la première notée (S) (configuration de l'atome de carbone portant une astérisque (\*)) et possédant 4 substituants différents dans la nomenclature C.I.P.) est un  $\beta$ -bloquant, la seconde noté (R) est un contraceptif.

### i. Activité optique dans le domaine linéaire

Nous ne traiterons que l'activité optique des molécules chirales, les édifices chiraux résultant d'un assemblage non centrosymétrique de constituants achiraux ne seront pas abordés ici. L'induction d'une direction privilégiée de l'espace et la rupture de la centrosymétrie qui en découlerait comme dans le cas de l'effet Faraday ne sera pas non plus traitée.

- Approximation non-locale :

La configuration d'une molécule est donnée par la disposition de ses atomes dans l'espace sans tenir compte des dispositions qui ne diffèrent que par des rotations autour des liaisons simples. Il est nécessaire d'introduire une sensibilité du champ électromagnétique interagissant avec le milieu chiral à la configuration moléculaire. Considérer le champ électrique comme uniforme à l'échelle de la molécule comme dans l'approximation dipolaire électrique ne permettrait pas de rendre compte de l'activité optique. Dans cette approximation, deux énantiomères ne seraient plus distingués par le champ. Il est donc nécessaire d'utiliser un développement spatial du champ incident. Le champ vu par chaque atome de la molécule sera différent. Cette approximation appelée « *non locale* » [Bloembergen, 1965], [Svirko 1998], consiste en un développement du champ au premier ordre en  $d/\lambda$ , où  $d$  correspond à la taille de la molécule (quelques Å) et  $\lambda$  à la longueur d'onde du rayonnement incident (environ 5000Å). Le développement du champ électrique au premier ordre en  $d/\lambda$  s'écrit :

$$\underline{E} = \underline{E}(0) + \underline{r} \cdot \underline{\nabla} \underline{E} \quad (\text{I.B-2}).$$

Il est ensuite possible de définir une polarisation effective (I.B-3) correspondant à la réponse linéaire du milieu à une onde électromagnétique monochromatique. Cette polarisation effective contient un terme de polarisation électrique  $\underline{P}$ , un terme dipolaire magnétique  $\underline{M}$  et un terme quadrupolaire électrique  $\underline{Q}$  [Jakson, 1975] :

$$\underline{P}^{(1)}_{\text{eff}} = \underline{P}^{(1)} + \frac{i}{\omega} \underline{\nabla} \wedge \underline{M}^{(1)} - \underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{Q}}^{(1)} \quad (\text{I.B-3})$$

Avec les expressions :

$$\underline{P}^{(1)} = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)ee} \underline{E} + \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)eVe} \underline{\nabla} \underline{E} \quad (\text{I.B-4})$$

$$\underline{M}^{(1)} = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)me} \underline{E} \quad (\text{I.B-5})$$

$$\underline{\underline{Q}}^{(1)} = \varepsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)qee} \underline{\underline{E}} \quad (\text{I.B-6})$$

Il est ensuite possible de symétriser et d'antisymétriser l'expression I.B-4. On écrit I.B-4 sous la forme :

$$P_i^{(1)} = \varepsilon_0 \chi_{ij}^{(1)ee} E_j(\omega) + \varepsilon_0 \chi_{ij}^{(1)em} B_j(\omega) + \varepsilon_0 \chi_{ijk}^{(1)eqe} \frac{\partial}{\partial x_j} E_k(\omega) \quad (\text{I.B-7})$$

$$\text{avec : } \chi_{ij}^{(1)em} = \frac{1}{2} i \omega e_{jkl} (\chi_{ijk}^{(1)e\nabla e} - \chi_{ikj}^{(1)e\nabla e}) \quad \text{antisymétrique} \quad (\text{I.B-8})$$

$$\text{et : } \chi_{ijk}^{(1)eqe} = \frac{1}{2} (\chi_{ijk}^{(1)e\nabla e} + \chi_{ikj}^{(1)e\nabla e}) \quad \text{symétrique} \quad (\text{I.B-9})$$

ce qui nous permet d'écrire finalement I.B-3 sous la forme :

$$\underline{P}_{eff}^{(1)} = \varepsilon_0 \chi^{(1)ee} \underline{\underline{E}} + \varepsilon_0 (\underline{\underline{\chi}}^{(1)em} + \underline{\underline{\chi}}^{(1)me}) \underline{\underline{B}} + \varepsilon_0 (\underline{\underline{\chi}}^{(1)eqe} + \underline{\underline{\chi}}^{(1)qee}) \nabla \underline{\underline{E}} \quad (\text{I.B-10})$$

Dans cette dernière expression, il est possible de relier les tenseurs d'origine non locale  $\chi^{(1)me}$  et  $\chi^{(1)em}$  aux contributions dipolaires magnétiques. De la même manière, les autres tenseurs d'origine non locale :  $\chi^{(1)eqe}$  et  $\chi^{(1)qee}$  peuvent être reliés aux contributions quadrupolaires électriques.

Le tenseur local  $\underline{\underline{\chi}}^{(1)ee}$  est un scalaire alors que les termes non locaux sont des pseudo scalaires, ils changent de signe suivant l'énanthiomère ou le sens de la polarisation circulaire incidente (dans une base circulaire). Les milieux possédant des composantes tensorielles non locales différentes de zéro possèdent une activité optique.

- Cas d'un milieu isotrope :

Dans un milieu isotrope, comme un liquide ou un gaz, un tenseur de rang 3 possède seulement 6 composantes non nulles. Le milieu est invariant par une rotation d'un angle de 90° autour de n'importe quel axe. En particulier,  $\chi_{ijk} = -\chi_{ikj}$  pour une rotation de 90° autour de l'axe

correspondant à l'indice  $i$ . Il existe donc seulement 6 composantes non nulles par permutation de 3 indices distincts.

Si le milieu isotrope est centrosymétrique (constitué de molécules achirales) tous les tenseurs de rang 3 s'annulent ( $\chi^{(1)ege}$  et  $\chi^{(1)gee}$ ). Les tenseurs de rang 2 :  $\chi^{(1)me}$ ,  $\chi^{(1)em}$ , agissant sur le champ magnétique (pseudo vecteur) sont également nuls. Il n'y a donc pas d'activité optique possible.

Dans un milieu isotrope (constitué de molécules chirales ou achirales),  $\chi^{(1)ege}$  et  $\chi^{(1)gee}$  étant des tenseurs symétriques (comme le quadrupole  $Q$ ), c'est-à-dire que  $\chi_{ijk}^{ege} = \chi_{ikj}^{ege}$ , les termes quadrupolaires du premier ordre sont nuls et ne contribuent pas à l'activité optique. Cette affirmation n'est bien sûr valable qu'au niveau macroscopique, rien n'interdit en effet qu'un moment quadrupolaire électrique soit présent au niveau microscopique.

Le terme  $\chi^{(1)ee}$  local d'origine dipolaire électrique ne contribue pas à l'activité optique. Seuls les termes non locaux magnétiques  $\chi^{(1)me}$  et  $\chi^{(1)em}$  contribuent à l'activité optique d'un milieu isotrope constitué de molécules chirales.

L'activité optique en régime linéaire dans une solution de molécules chirales est donc d'origine dipolaire magnétique.

## ii. Effets non linéaires du second ordre

- Approximation non-locale :

Nous allons utiliser l'expression I.B-3 de la polarisation effective d'ordre 1, pour la généraliser à l'ordre 2 [Pershaw, 1963], [Adler, 1964], [Guyot-Sionnest, 1988] :

$$\underline{P}^{(2)}_{eff} = \underline{P}^{(2)} + \frac{i}{\omega} \underline{\nabla} \wedge \underline{M}^{(2)} - \underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{Q}}^{(2)} \quad (\text{I.B-11})$$

Avec :

$$\begin{aligned} \underline{P}^{(2)} = & \varepsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)eee} \underline{E}_1 \underline{E}_2 + \varepsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)ege} \underline{E}_1 \underline{\nabla} \underline{E}_2 + \varepsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)eqee} \underline{\nabla} \underline{E}_1 \underline{E}_2 \\ & + \varepsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)eem} \underline{E}_1 \underline{B}_2 + \varepsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)eme} \underline{B}_1 \underline{E}_2 \end{aligned} \quad (\text{I.B-12})$$

$$\underline{\underline{M}}^{(2)} = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(2)mee} \underline{\underline{E}}_1 \underline{\underline{E}}_2 \quad (\text{I.B-13})$$

$$\underline{\underline{Q}}^{(2)} = \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)qeee} \underline{\underline{E}}_1 \underline{\underline{E}}_2 \quad (\text{I.B-14}).$$

- Cas d'un milieu isotrope :

Le premier tenseur  $\chi^{(2)eee}$  (local) est de rang 3, il est donc non nul seulement si le milieu isotrope est non centrosymétrique (même discussion que pour le cas linéaire pour les tenseurs de rang 3). C'est le cas par exemple d'un liquide contenant des espèces chirales. Il est alors possible d'observer une somme de fréquence non dégénérée, en géométrie non colinéaire et en polarisations croisées [Giordmaine, 1965]. La réalisation expérimentale est très délicate, les signaux observables étant très faibles [Belkin, 2001]. Il existe donc des effets non linéaires d'ordre 2 d'origine dipolaire électrique dans les liquides composés de molécules chirales.

Les tenseurs d'ordre 4 (ici non locaux) sont non nuls même dans un liquide isotrope centrosymétrique, et permettent une génération de second harmonique. Mais dans le cas de molécules chirales, il est impossible d'extraire un signal spécifique de la chiralité dans un liquide. Les termes non locaux de mélange à 3 ondes interfèrent avec des termes locaux de mélanges à 4 ondes de plus grande amplitude. L'interprétation est rendue très difficile.

- Cas d'une surface :

La brisure de symétrie induite par une surface implique l'existence de nouvelles composantes tensorielles non nulles, il sera donc possible de mener des expériences de génération de second harmonique sur des surfaces (cf partie A de ce chapitre). Pour des molécules chirales déposées sur une surface, les susceptibilités locales d'ordre 2 et non locales sont toutes non nulles, le signal de second harmonique produit par la surface provient d'un mélange de termes chiraux et achiriaux (provenant de la surface cf. I)A.iv.). Mais par l'utilisation d'une combinaison judicieuse de polarisations incidentes, dans le cas d'une surface isotrope, il est possible de faire ressortir séparément chacune de ces composantes. Des premières expériences ont été menées par Petralli en 1993 et Byers en 1994 dans le groupe de J.Hicks sur du binaphtol, le groupe d'A. Persoons [Kauranen, 1994], [Maki, 1996] a utilisé un poly-

isocyanide chiral, des travaux expérimentaux et théoriques ont eu lieu ensuite [Stolle, 1994] ; [Crawford, 1994] ; [Hecht, 1996] ; [Angeluts, 1996] ; [Schanne, 1998] ; [Schanne, 2002].

### iii. Génération de second harmonique par un film de molécules chirales

- Aspects tensoriels :

Il est possible de calculer le champ électrique rayonné à  $2\omega$  à partir de l'expression (I.B-15) [Jackson, 1975] :

$$\underline{E}(2\omega) \propto \left[ (\underline{n} \times \underline{P}^{(2)}) \times \underline{n} - \frac{1}{c} \underline{n} \times \underline{M}^{(2)} - \frac{ik}{2} (\underline{n} \times \underline{Q}^{(2)}) \times \underline{n} \right] \quad (\text{I.B-15})$$

Avec :

$$\underline{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \underline{\chi}_{\equiv}^{(2)eee} \underline{EE} + \varepsilon_0 \underline{\chi}_{\equiv}^{(2)eem} \underline{EB} + \varepsilon_0 \underline{\chi}_{\equiv}^{(2)eqe} \underline{E\nabla E} \quad (\text{I.B-16})$$

$$\underline{M}^{(2)} = \varepsilon \underline{\chi}_{\equiv}^{(2)mee} \underline{EE} \quad (\text{I.B-17})$$

$$\underline{Q}^{(2)} = \varepsilon_0 \underline{\chi}_{\equiv}^{(2)qee} \underline{EE} \quad (\text{I.B-18})$$

$$\underline{n} = n_{II} (\sin \theta_{II} \underline{u}_x + \cos \theta_{II} \underline{u}_z) \quad (\text{I.B-19})$$

pour une surface contenue dans le plan (Oxy) de normale (Oz).

L'angle  $\theta_{II}$  du vecteur d'onde du champ de second harmonique est défini par la relation :

$$n_{II} \sin \theta_{II} = n_I \sin \theta_I \quad (\text{I.B-20}).$$

$\theta_I$  correspond à l'angle d'incidence du faisceau par rapport à l'axe (Oz),  $n_I$  et  $n_{II}$  désigne respectivement les indices du milieu extérieur à  $\omega$  et à  $2\omega$ . Il est légitime de négliger tout effet dispersif dans le milieu extérieur (air) aux longueurs d'ondes considérées. On a alors égalité des deux angles  $\theta_I$  et  $\theta_{II}$ .

Le champ magnétique peut être relié au champ électrique par l'équation (I.B-21) :

$$\underline{B} = \underline{n}_H^i \times \underline{E} \quad (\text{I.B-21})$$

$$\text{avec } \underline{n}_H^i = n_H (\sin \theta_H \underline{u}_x - \cos \theta_H \underline{u}_z) \quad (\text{I.B-22}).$$

Dans le cas d'une surface isotrope, s'il s'agit de molécules chirales le système est invariant par symétrie  $C_\infty$ , si les molécules sont achirales, il demeure invariant par symétrie  $C_{\infty v}$ . Les composantes non nulles de ces 5 tenseurs sont écrites dans le tableau I)B.1 [Giordmaine, 1965].

	Composantes achirales $C_{\infty v}$	Composantes chirales $C_\infty$
$\chi^{(2)eee}$	$zzz, zxx = zyy, xxz = xzx = yyz = yzy$	$xyz = xzy = -yxz = -yzx$
$\chi^{(2)eem}$	$xyz = -yxz, xzy = -yzx, zxy = -zyx$	$zzz, zxx = zyy, xxz = yyz, xzx = yzy$
$\chi^{(2)mee}$	$xyz = xzy = -zxy = -yzx$	$zzz, zxx = zyy, xxz = xzx = yyz = yzy$
$\chi^{(2)eqq}$	$xxxx, zzzz, xxyy, xxyy = xyxy, xxzz,$ $xzxz = xzzx, zzzx, zxzx = zxxz$	$xyyy, yxxy, yyxy = yyyy, xyz, xyzz,$ $xzyz = xzzy, zxzy = zxzy$
$\chi^{(2)qee}$	$xxxx, zzzz, xxyy, xyxy = xyxy, xxzz, xzx = zxxz,$ $xzzx = zxzx, zzzx$	$xyyy = yxxy, yyxy, yyyy,$ $xzzy = zxzy$

**Tableau I)B.1 :** composantes des susceptibilités non linéaires pour des surfaces invariantes par  $C_\infty$  (surface constituée de molécules chirales) et  $C_{\infty v}$  ( $z$  désigne la normale à la surface,  $x$  et  $y$  sont deux directions orthogonales contenues dans le plan de la surface). Pour les deux derniers tenseurs d'origine quadrupolaire électrique, la permutation de  $x$  et de  $y$  change le signe des composantes chirales mais pas des composantes achirales.

Les termes dipolaires électriques (locaux) interviennent dans le tenseur  $\chi^{(2)eee}$ . Celui-ci possède des composantes à priori non nulles pour des molécules chirales. Il sera donc éventuellement possible d'observer une activité optique pour le signal de SHG d'origine dipolaire électrique.

Hors résonance, les susceptibilités d'origine dipolaire électrique ( $\chi^{eee}$ ) sont réelles, car le champ rayonné par un dipôle électrique est en phase avec le champ électrique incident interagissant avec ce dipôle.

Les susceptibilités d'origine dipolaires magnétiques ( $\chi^{eem}$  et  $\chi^{mee}$ ) sont des imaginaires purs, car le champ rayonné par un dipôle magnétique est en quadrature de phase avec le champ électrique incident (hors résonance). Les termes d'origine quadrupolaire électrique ( $\chi^{eq}$  et  $\chi^{qe}$ ) sont eux aussi en quadrature de phase avec le champ incident, à cause du terme en gradient(hors résonance). Il est donc possible de distinguer les termes dipolaires électriques des termes dipolaires magnétiques ou quadrupolaires électriques. Cependant, il est impossible de distinguer expérimentalement les contributions dipolaires magnétiques des contributions quadrupolaires électriques [Pershan, 1963], [Schanne, 1998].

- Résolution en polarisation :

Il est pertinent expérimentalement d'écrire le champ électrique de second harmonique sur la base des polarisations p et s liées à l'onde. On introduit alors les coefficients f,g et h pour obtenir l'expression [Maki, 1995], [Kauranen, 1994] :

$$E_{s,p}^r(2\omega) = \frac{i4\pi\omega/ct_{s,p}^{II/I}}{n_{II} \cos\theta_{II}} (f_{s,p} E_p^2(\omega) + g_{s,p} E_s^2(\omega) + h_{s,p} E_p(\omega) E_s(\omega)) \quad (\text{I.B-23}).$$

Dans le cas d'une polarisation incidente rectiligne suivant la direction p, le champ réfléchi à  $2\omega$  par la surface s'écrit :

$$E_{s,p}^r = \frac{i4\pi\omega/ct_{s,p}^{II/I}}{n_{II} \cos\theta_{II}} f_{s,p} E_p^2(\omega) \quad (\text{I.B-24}).$$

Cette expression a été introduite pour la première fois par Kauranen en 1994 et Maki en 1995. Les expressions des coefficients sont données par les relations I.B-25, 26, 27, 28, 29 et 30 [Schanne, 1998], à partir des relations I.B-19,20,21,22 et I.B-23 :

$$f_s = \left(t_p^{I/II}\right)^2 \left[ 2\chi_{xyz}^{eee} \sin\theta_{II} \cos\theta_{II} + 2\chi_{xxz}^{eem} n_{II} \sin\theta_{II} + 2\chi_{xxz}^{mee} n_{II} \cos^2\theta_{II} \sin\theta_{II} - \chi_{zxx}^{mee} n_{II} \cos^2\theta_{II} \sin\theta_{II} - \chi_{zzz}^{mee} n_{II} \sin^3\theta_{II} \right] \quad (\text{I.B-25}).$$

$$g_s = -\left(t_s^{I/II}\right)^2 \left[ 2\chi_{xxz}^{eem} + \chi_{zxx}^{mee} \right] n_{II} \sin\theta_{II} \quad (\text{I.B-26}).$$

$$h_s = t_s^{I/II} t_p^{I/II} \left[ 2\chi_{xxz}^{eee} \sin \theta_{II} - 2(\chi_{xyz}^{mee} + \chi_{xzy}^{eem} + \chi_{xyz}^{eem}) n_{II} \sin \theta_{II} \cos \theta_{II} \right] \quad (I.B-27).$$

$$\begin{aligned} f_p = & \left( t_p^{I/II} \right)^2 \left[ -2\chi_{xxz}^{eee} \sin \theta_{II} \cos^2 \theta_{II} + \chi_{zxx}^{eee} \sin \theta_{II} \cos^2 \theta_{II} + \chi_{zzz}^{eee} \sin^3 \theta_{II} \right. \\ & \left. + 2(\chi_{xzy}^{eem} - \chi_{zxy}^{eem} + \chi_{xyz}^{mee}) n_{II} \sin \theta_{II} \cos \theta_{II} \right] \end{aligned} \quad (I.B-28).$$

$$g_p = \left( t_s^{I/II} \right)^2 \left[ \chi_{zxx}^{eee} \sin \theta_{II} - 2(\chi_{xyz}^{eem} + \chi_{zxy}^{eem}) n_{II} \sin \theta_{II} \cos \theta_{II} \right] \quad (I.B-29).$$

$$\begin{aligned} h_p = & t_s^{I/II} t_p^{I/II} \left[ 2\chi_{xyz}^{eee} \cos \theta_{II} \sin \theta_{II} + 2(\chi_{xxz}^{eem} + \chi_{zxx}^{eem}) n_{II} \sin \theta_{II} \cos^2 \theta_{II} \right. \\ & \left. + 2(\chi_{zxx}^{eem} - \chi_{zzz}^{eem}) n_{II} \sin^3 \theta_{II} + 2\chi_{xxz}^{mee} n_{II} \sin \theta_{II} \right] \end{aligned} \quad (I.B-30).$$

Les coefficients  $t$  correspondent aux coefficients de Fresnel en transmission pour la polarisation s ou p. Nous ne faisons pas apparaître les contributions quadrupolaires électriques dans les expressions précédentes par souci de simplification car elles ne sont pas discernables des contributions dipolaires magnétiques.

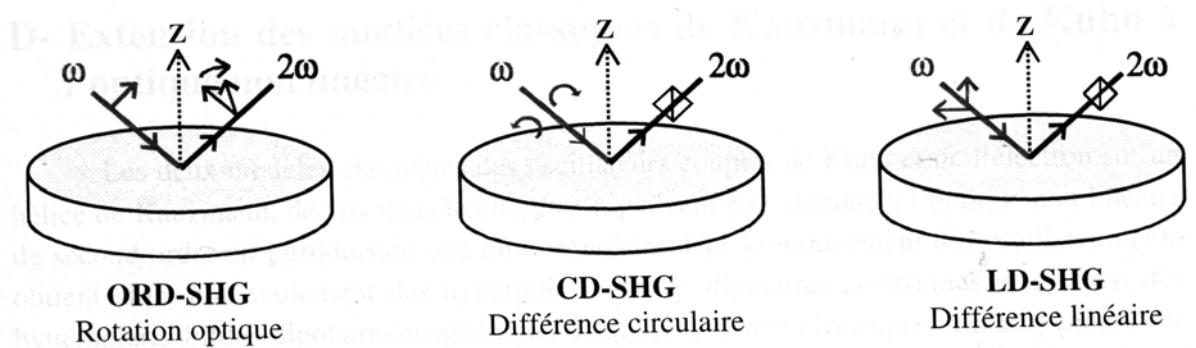
En utilisant le tableau I)B.1, nous en déduisons que les termes  $f_s$ ,  $g_s$  et  $h_p$  contiennent des termes non nuls seulement pour des molécules chirales (coefficients appelés par extension « chiraux ») ; tandis que  $f_p$ ,  $g_p$  et  $h_s$  sont non nuls même pour des molécules achirales (coefficients appelés par extension « achiraux »). Tous les coefficients contiennent des termes venant d'interactions locales et non locales à l'exception de  $g_s$  d'origine non locale (puisque il s'agit de la somme des composantes des tenseurs :  $\chi^{eem}$  et  $\chi^{mee}$  d'origine dipolaire magnétique).

Les coefficients sont complexes (une partie imaginaire non nulle correspond à un déphasage entre le champ incident et celui de second harmonique). Hors résonance, nous en déduirons que la partie réelle des coefficients vient de  $\chi^{eee}$ , et leur partie imaginaire provient de  $\chi^{eem}$  et  $\chi^{mee}$ . Ainsi, une mesure du déphasage entre les différentes contributions du signal de SHG nous permettra de séparer les contributions électriques des contributions magnétiques.

Nous allons montrer qu'au niveau expérimental, une combinaison de polarisations judicieuse permettra d'isoler la contribution de la chiralité au signal de second harmonique généré par une surface. Ceci va faire l'objet du point suivant.

- Paramètres d'intérêt :

Il y a trois expériences pertinentes à mener (cf figure I)B.3) :



**Figure I)B.3 :** différentes expériences d'analyse polarimétrique du signal de second harmonique généré par une surface.

- ♦ Une analyse de la polarisation du champ électrique de second harmonique réfléchi est effectuée pour une polarisation incidente p. Une surface achirale générera un signal uniquement sur la polarisation p, toute rotation d'angle  $\Phi$  par rapport à cette direction impliquera la présence de molécules chirales. L'intensité ( $I$ ) du signal transmis par un analyseur faisant l'angle  $\Phi_p$  avec la direction p sera :

$$I = \left| E_p(2\omega) \cos \Phi_p + E_s(2\omega) \sin \Phi_p \right|^2 \quad (\text{I.B-31}).$$

En considérant des expressions complexes de

$$f_{s,p} = f'_{s,p} + i f''_{s,p} \quad (\text{I.B-32}).$$

Il est possible d'écrire l'intensité comme une combinaison des parties réelles et imaginaires de  $f$  :

$$I = \left\{ \left| f_p \right|^2 \cos^2 \Phi_p + \left| f_s \right|^2 \sin^2 \Phi_p + 2(f'_p f'_s + f''_p f''_s) \sin \Phi_p \cos \Phi_p \right\} |E_p(\omega)|^2 \quad (\text{I.B-33}).$$

A partir de l'équation I.B-33, il sera possible d'ajuster les résultats expérimentaux pour en déduire la valeur des coefficients  $f$  et  $\Phi_p$ .

L'angle de rotation  $\Phi_{mp}$  minimal pour lequel  $I$  est maximum est donné par les relations I.B-34,35 et 36 :

$$\tan 2\Phi_{mp} = \frac{2(f'_p f'_s + f''_p f''_s)}{\left| f_p \right|^2 - \left| f_s \right|^2} \quad (\text{I.B-34}).$$

$$\begin{cases} \text{Si } \left| f_p \right|^2 - \left| f_s \right|^2 > 0 & \Phi_{mp} = \frac{1}{2} \text{Arc} \tan \frac{2(f'_p f'_s + f''_p f''_s)}{\left| f_p \right|^2 - \left| f_s \right|^2} \end{cases} \quad (\text{I.B-35}).$$

$$\begin{cases} \text{Si } \left| f_p \right|^2 - \left| f_s \right|^2 < 0 & \Phi_{mp} = \frac{1}{2} \text{Arc} \tan \frac{2(f'_p f'_s + f''_p f''_s)}{\left| f_p \right|^2 - \left| f_s \right|^2} + \frac{\pi}{2} \end{cases} \quad (\text{I.B-36}).$$

La rotation ainsi constatée est appelée ORD-SHG [Byers, 1994], [Crawford, 1994], en comparaison des expériences de rotation (ORD) lors d'un diagnostic linéaire.

Si les molécules déposées sont achirales, alors  $f_s$  est nul,  $f'_p f'_s + f''_p f''_s$  s'annule et donc  $\Phi_{mp}$  également.

- ♦ On procède à une analyse de la polarisation du champ électrique de second harmonique pour des polarisations fondamentales incidentes circulaires droite et gauche [Kauranen, 1994], [Crawford, 1994]. Pour poursuivre l'analogie avec la polarimétrie linéaire, nous parlerons de CD-SHG, ou de différence circulaire pour la génération de second harmonique. L'analogie est simplement formelle puisqu'il ne s'agit pas d'un phénomène d'absorption mais bien d'une émission cohérente de second harmonique. On définit la grandeur CD comme un contraste entre les signaux à  $2\omega$  obtenus pour chaque polarisation circulaire

(L pour left et R pour right), l'indice p ou s correspond à la position de l'analyseur :

$$CD_{s,p} = \frac{\Delta I_{p,s}^{CD-SHG}}{I_{s,p \text{ av}}} = \frac{I_{L;s,p}(2\omega) - I_{R;s,p}(2\omega)}{\frac{1}{2}(I_{L;s,p}(2\omega) + I_{R;s,p}(2\omega))} \quad (\text{I.B-37}).$$

Ce qui donne à partir de I.B-23 et I.B-37 :

$$CD_{s,p} = \frac{4[(f''_{s,p} - g''_{s,p})h'_{s,p} - (f'_{s,p} - g'_{s,p})h''_{s,p}]}{|f_{s,p}|^2 + |g_{s,p}|^2 + |h_{s,p}|^2 - 2(f'_{s,p}g'_{s,p} + f''_{s,p}g''_{s,p})} \quad (\text{I.B-38}).$$

Les valeurs de CD sont différentes de zéro seulement en présence de molécules chirales (le numérateur étant toujours nul dans le cas de molécules achirales).

Il est ensuite possible de calculer l'intensité rayonnée à  $2\omega$  en fonction de l'angle  $\theta_{wp}$  (formé entre la direction de la polarisation du faisceau incident et un axe de la lame quart d'onde qu'il traverse) [Maki, 1996]. Ceci nous permettra, en ajustant nos résultats expérimentaux avec l'expression I.B-39 (en omettant les indices p et s), d'en déduire les valeurs des coefficients f,g et h :

$$I(2\omega) = K_{CD}^2 \left[ (f' - g' + 4f'' \cos 2\theta_{wp} - (f' - g') \cos 4\theta_{wp} + 2h'' \sin 2\theta_{wp} - h' \sin 4\theta_{wp})^2 + (f'' - g'' - 4f' \cos 2\theta_{wp} - (f'' - g'') \cos 4\theta_{wp} - 2h' \sin 2\theta_{wp} - h'' \sin 4\theta_{wp})^2 \right] \quad (\text{I.B-39}).$$

- ♦ La dernière mesure est identique au CD-SHG précédent en utilisant des polarisations linéaires à  $+45^\circ$  et  $-45^\circ$ , elle s'appellera LD-SHG, pour différence linéaire [Verbiest, 1995]. On définira de même les coefficients  $LD_{s,p}$  (en omettant dans les expressions I.B-40, 41 et 42 les indices s et p) :

$$LD_{s,p} = \frac{\Delta I}{I_{av}} = \frac{I_{-45^\circ}(2\omega) - I_{+45^\circ}(2\omega)}{\frac{1}{2}(I_{-45^\circ}(2\omega) + I_{+45^\circ}(2\omega))} \quad (\text{I.B-40}).$$

Le calcul à partir de I.B-23 et I.B-32 donne :

$$LD_{s,p} = \frac{-4[(f' + g')h' + (f'' + g'')h'']}{|f|^2 + |g|^2 + |h|^2 + (fg' + f'g'')} \quad (\text{I.B-41}).$$

Les valeurs de LD sont non nulles seulement pour des molécules chirales (le numérateur s'annulant pour des molécules achirales).

L'intensité détectée en fonction de l'angle  $\theta_{wp}$  (formé entre la direction de la polarisation du faisceau incident et un axe de la lame demi onde qu'il traverse) est donnée par l'expression I.B-42 (en omettant les indices p et s). Un ajustement des valeurs expérimentales par cette fonction de  $\theta_{wp}$  fournira les valeurs des coefficients f, g et h.

$$I(2\omega) = K_{LD}^2 \left[ \left( f' + g' + (f' - g') \cos 4\theta_{wp} + h' \sin 4\theta_{wp} \right)^2 + \left( f'' + g'' + (f'' - g'') \cos 4\theta_{wp} + h'' \sin 4\theta_{wp} \right)^2 \right] \quad (\text{I.B-42}).$$

- Commentaires :

Un point important à remarquer est que ces coefficients ne dépendent pas de la densité de molécules adsorbées, ceux-ci faisant intervenir des rapports de susceptibilités (vérification expérimentale par Byers en 1994).

Les expressions de la rotation et de la différence linéaire sont non nulles pour un produit de coefficients « chiraux » et « achiriaux » en phase. En effet, les numérateurs des expressions I.B-34 et 41 font intervenir les sommes  $f'_p f'_s + f''_p f''_s$  et  $(f' + g')h' + (f'' + g'')h''$  où apparaissent

seulement des produits entre parties réelles des coefficients et entre parties imaginaires, avec  $f_s, g_s, h_p \ll$  chiraux» et  $f_p, g_p, h_s \ll$  achiraux».

Un raisonnement identique montre que la différence circulaire est non nulle pour un produit de coefficients en quadrature de phase (produits de parties réelles et parties imaginaires :

$$(f''_{s,p} - g''_{s,p})h'_{s,p} - (f'_{s,p} - g'_{s,p})h''_{s,p}).$$

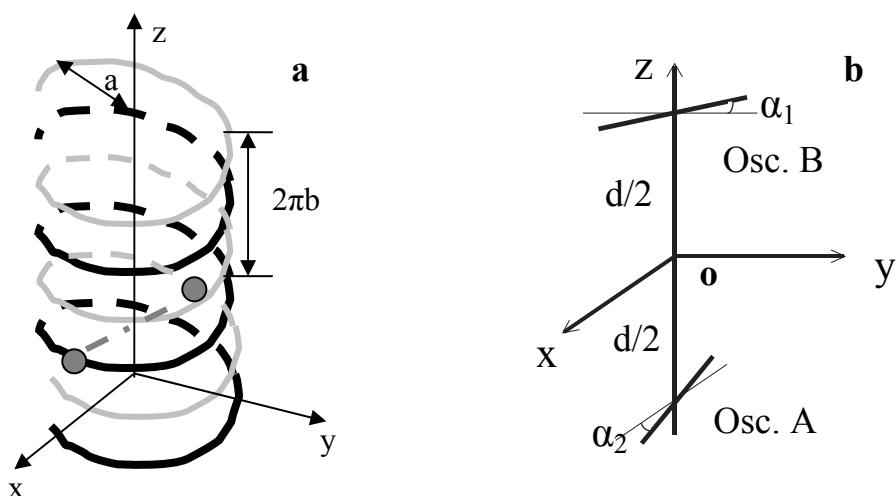
Si les coefficients achiraux sont dominés par des termes dipolaires électriques, les expériences d'ORD-SHG et de LD-SHG seront sensibles aux propriétés chirales des molécules dans une interaction locale avec le champ électromagnétique (origine dipolaire électrique), le CD-SHG sera sensible à celle d'origine non locale (origine quadrupolaire électrique ou dipolaire magnétique).

La question de la localité de l'interaction sera à rapprocher d'une modélisation microscopique de la chiralité, une compréhension approfondie des mécanismes mis en jeu sera alors possible.

#### iv. Modélisations microscopiques de la chiralité

Nous allons utiliser deux modèles, celui de Kuhn et de Kauzmann, pour décrire l'activité optique d'une molécule chirale. Ces modèles ont été développés pour rendre compte de l'activité optique dans le domaine linéaire, il nous sera utile des les étendre à l'optique non linéaire. Nous insisterons surtout sur le modèle de Kuhn qui est le modèle le mieux adapté aux molécules que nous avons étudiées (ASTB, collagène I).

Le modèle de Kauzmann décrit le mouvement hélicoïdal de charges liées harmoniquement diamétralement opposées (figure I)B.1.a) [Kauzmann, 1957]. Le modèle de Kuhn propose d'étudier le couplage de deux oscillateurs harmoniques, placés dans deux plans orthogonaux ( $xoz$ ) et ( $yoz$ ) [Kuhn, 1929]. Chacun formant respectivement un angle non nul avec l'axe ( $ox$ ) et ( $oy$ ) (figure I)B.1.b).



**Figure I)B.1.** a : : modèle de Kauzmann, chaque électron (en gris sombre) peut se mouvoir sur une hélice (noire ou gris clair).b : modèle de Kuhn, chaque oscillateur est dans un plan distinct ( $xy$ ) pour l'oscillateur A, ( $yz$ ) pour l'oscillateur B.

- Méthode générale :

Dans les modèles phénoménologiques employés, nous nous placerons à l'échelle moléculaire. Nous considérons un ensemble d'oscillateurs harmoniques de fréquence propre notée  $\omega_0$ . Le champ incident oscille à la pulsation  $\omega$ .

Afin de décrire des effets non linéaire du deuxième ordre, on introduit une anharmonicité dans la force de rappel  $\underline{F}$  d'un oscillateur [Hache, 2001] :

$$\underline{F} = -m\omega_0 r \underline{u}_r - m\beta r^2 \underline{u}_r \quad (\text{I.B-43}).$$

$\beta$  change de signe suivant l'énantiomère considéré.

A partir de l'équation du mouvement (approche classique) des charges soumises à la force électrique, à la force de rappel, il est possible de calculer les moments dipolaires ( $p=qr$ ,  $q$  désignant la charge en mouvement à la position  $\underline{r}$ ), quadrupolaire électrique ( $q_{ij}=qr_i r_j$ ) et dipolaire magnétique ( $m=q\underline{r} \wedge \underline{r}'$ ,  $\underline{r}'$  correspondant à la vitesse de la charge  $q$ ) à  $2\omega$ . Il est ensuite possible de calculer les tenseurs d'hyperpolarisabilité locaux et non locaux en comparant les résultats obtenus aux expressions des moments dipolaires et quadrupolaires microscopiques donnés par :

$$p_i(2\omega) = \epsilon_0 \beta_{ijk}^{eee} E_j(\omega) E_k(\omega) + 2\epsilon_0 \beta_{ijk}^{eem} E_j(\omega) B_k(\omega) + 2\epsilon_0 \beta_{ijkl}^{eeqe} E_j(\omega) \nabla_k E_l(\omega) \quad (\text{I.B-44})$$

$$m_i(2\omega) = \epsilon_0 \beta_{ijk}^{mee} E_j(\omega) E_k(\omega) \quad (\text{I.B-45})$$

$$q_{ij}(2\omega) = \epsilon_0 \beta_{ijkl}^{qeee} E_k(\omega) E_l(\omega) \quad (\text{I.B-46}).$$

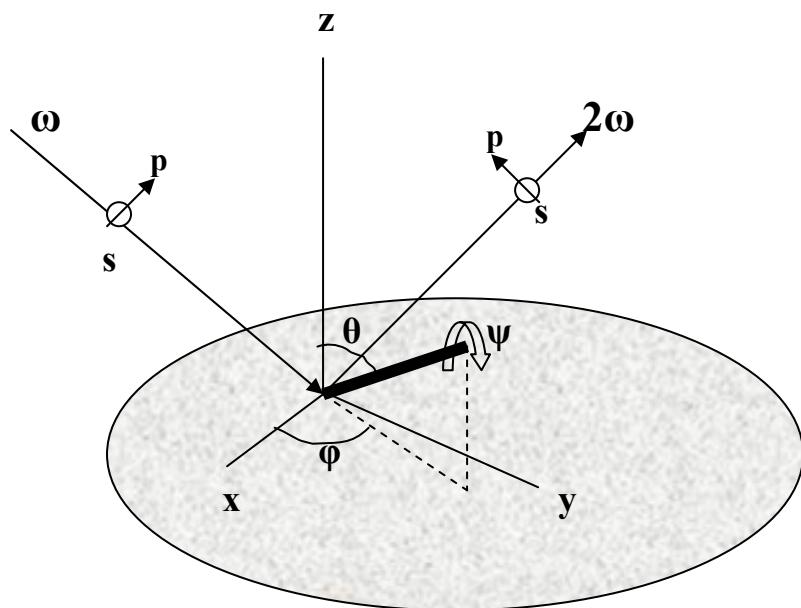
Les valeurs obtenues pour une molécule doivent ensuite être moyennées spatialement sur l'ensemble des molécules afin d'obtenir les expressions des susceptibilités. Comme nous l'avons précisé dans la partie A de ce chapitre, le moyennage doit tenir compte des liaisons existantes entre les molécules adsorbées et la surface. Le calcul s'effectue donc d'après l'expression I.B-26 :

$$\chi_{ijk}^{***(2)} = N_s \left\langle (\underline{I.i})(\underline{J.j})(\underline{K.k}) \right\rangle_{av-compatible} \beta_{IJK}^{***(2)} \quad (\text{I.B-47}).$$

Les paramètres géométriques introduits pour décrire l'implantation des molécules sur la surface sont précisés sur la figure I.A.2. La densité surfacique vaut  $N_s$ , l'angle azimutal  $\varphi$  est aléatoire pour une surface isotrope, l'angle de rotation propre  $\psi$  est soit aléatoire, soit relié à l'angle de nutation  $\theta$  (à cause de la géométrie de l'édifice déposé sur la surface).

Par exemple, pour des molécules déposées sur le plan (xoy), le moyennage ( $\phi$  et  $\psi$  aléatoires) fournit l'expression de  $\chi_{xyz}^{eee}$  (chirale) :

$$\chi_{xyz}^{eee} = N_S \frac{\langle 3\cos^2 \theta - 1 \rangle}{4} (\beta_{xyz}^{eee} - \beta_{yxz}^{eee}) \quad (\text{I.B-48}).$$



**Figure I)A.2 :** définitions des angles d'Euler dans le repère du laboratoire. Ils sont nécessaires à la description de l'orientation de la molécule représentée par un segment noir,  $\theta$  : angle de nutation,  $\phi$  : angle azimutal,  $\psi$  : rotation propre. L'angle d'incidence est à  $45^\circ$  de la normale comme lors des expériences.

La vérification expérimentale de l'anisotropie de la surface s'effectue en faisant tourner l'échantillon autour de l'axe ( $Oz$ ), cette opération ne doit en rien modifier le signal de second harmonique. Pour être certain expérimentalement qu'il n'y a aucun arrangement supramoléculaire chiral, il faut pouvoir mesurer le signal provenant de chaque énantiomère successivement, en s'assurant que les composantes chirales sont bien de signe opposé pour chaque énantiomère.

- Modèle de Kauzmann :

Le modèle considère deux électrons mobiles sur deux hélices identiques coaxiales, les particules restent diamétralement opposés par rapport à cet axe (figure I)A.1.a). Intuitivement, on pressent que l'activité optique trouve son origine dans le moment dipolaire magnétique induit par un mouvement hélicoïdal des électrons.

Le modèle permet de calculer l'angle  $\varphi$  repérant la position des électrons. Grâce à un développement spatial du champ électrique incident (non localité de l'interaction), il est alors possible de calculer les moments dipolaires électriques et magnétiques et quadrupolaires électriques.

On trouve que les hyperpolarisabilités :  $\beta_{zzz}^{eee}, \beta_{zzz}^{eem}, \beta_{zzz}^{mee}, \beta_{zzx}^{eeqe} = -\beta_{zyy}^{eeqe}, \beta_{zzxy}^{eeqe} = \beta_{zyyx}^{eeqe}, \beta_{zzzz}^{eeqe}$  sont non nulles.

Les 5 dernières hyperpolarisabilités d'origine quadrupolaire électrique s'annuleront ensuite par moyennage sur la surface isotrope, comme cela avait été prévu par raison de symétrie dans le tableau 1.

Le moyennage spatial fournit les susceptibilités suivantes non nulles (nous précisons leur origine et leur contribution aux paramètres polarimétriques f,g et h introduits en I.B-23 :

$$\begin{aligned}\chi_{xxz}^{eee} &= \chi_{zxx}^{eee} \rightarrow f_p, g_p, h_s : \text{« Achiraux »} \\ \chi_{zzz}^{eee} &\rightarrow f_p : \text{« Achiraux »} \\ \chi_{xxz}^{eem} &= \chi_{zxx}^{eem} = \chi_{xxz}^{mee} = \chi_{zxx}^{mee} \rightarrow f_s, g_s, h_p : \text{« Chiraux »} \\ \chi_{zzz}^{mee} &= \chi_{zzz}^{eem} \rightarrow f_s, h_p : \text{« Chiraux »}.\end{aligned}$$

Il apparaît ainsi que les effets chiroptiques ne proviennent pas de contributions dipolaires électriques (terme local), mais de contributions dipolaires magnétiques (termes non locaux), les termes  $\chi^{mee}$  ou  $\chi^{eem}$  étant non nuls seulement pour des molécules chirales.

Il est possible de montrer que le rapport entre les contributions chirales et achirales varie comme  $a^2/\lambda b$  (cf figure I)B.1.a) et est donc faible.

On s'attend, d'après le commentaire du paragraphe détaillant la résolution en polarisation, à ne mesurer aucun LD et ORD pour des molécules suivant le modèle de Kauzmann (mesures sensibles aux termes chiraux locaux lorsque les effets dipolaires électriques dominent les

termes achiraux). Des valeurs de CD non nulles sont en revanche attendues, le CD étant sensible aux composantes chirales non locales.

Des expériences de SHG en surface, menées sur des molécules chirales présentant un atome de carbone possédant 4 substituants différents permet expérimentalement de retrouver ces prédictions [Schanne, 1998].

- Modèle de Kuhn : oscillateurs couplés.

Deux oscillateurs notés A et B non coplanaires, sont couplés par une interaction dipôle-dipôle de constante de couplage  $\kappa$ . La géométrie adoptée est exposée sur la figure I)A.1.b Ce qui distingue un énantiomère d'un autre, c'est le signe de  $\alpha$  et de  $\kappa$ . On note respectivement  $a$  et  $b$  les écarts aux positions d'équilibre des électrons sur chaque oscillateur A et B, les coordonnées des charges sont alors  $(a.\cos\alpha, 0, -d/2-a.\sin\alpha)$  et  $(0, b.\cos\alpha, d/2+b.\sin\alpha)$  avec  $\alpha = |\alpha_1| = |\alpha_2|$ . La force de rappel des électrons sur chaque oscillateur est donnée en I.B-43. Elle s'écrit ici pour l'oscillateur A :

$$F = -m\omega_0^2 a - m\beta a^2 \quad (\text{I.B-49}).$$

La valeur du potentiel d'interaction entre les dipôles est gouvernée par un couplage électrostatique entre les dipôles [Rodger, 1997]:

$$V = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{\underline{ab} - 3(\underline{R}_{ab}\underline{a})(\underline{R}_{ab}\underline{b})}{R_{ab}^3} \quad (\text{I.B-50}).$$

$\underline{R}_{ab}$  désigne le vecteur reliant le centre des deux dipôles, il est possible d'écrire sa norme sous la forme :

$$R_{ab}^2 = 2D_0^2 \cos^2 \alpha + d^2 \quad (\text{I.B-51})$$

en notant  $D_0$  la distance entre le centre de chaque oscillateur et l'axe (Oz). En utilisant cette expression dans I.B-50 on obtient :

$$V = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{ab}{R_{ab}^3} \left( \sin^2 \alpha + 3 \frac{D_0^2 \cos^4 \alpha - d^2 \sin^2 \alpha}{R_{ab}^2} \right) \quad (\text{I.B-52}).$$

Ce qui permet de préciser la valeur de la constante de couplage  $\kappa$  en fonction de la géométrie utilisée :

$$V = \kappa ab = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{R_{ab}^3} \left( \sin^2 \alpha + 3 \frac{D_0^2 \cos^4 \alpha - d^2 \sin^2 \alpha}{R_{ab}^2} \right) ab \quad (\text{I.B-53}).$$

En utilisant les paramètres géométriques de la molécule il sera possible d'en déduire une valeur de  $\kappa$ .

Lors de l'interaction du champ avec la molécule, nous ne tenons pas compte du développement spatial du champ au premier ordre en  $r$ . On obtient les équations du mouvement couplé des charges, il s'agit d'un système reliant  $a$  et  $b$  :

$$\begin{cases} D_\omega a^{(1)} + \kappa b^{(1)} = \frac{-e}{m} [E_x \cos \alpha - E_z \sin \alpha] \end{cases} \quad (\text{I.B-54})$$

$$\begin{cases} \kappa a^{(1)} + D_\omega b^{(1)} = \frac{-e}{m} [E_y \cos \alpha + E_z \sin \alpha] \end{cases} \quad (\text{I.B-55})$$

$$\text{avec : } D_\omega = \omega_0^2 - \omega^2 - 2i\gamma\omega \quad (\text{I.B-56})$$

La fréquence  $\omega_0$  et le coefficient  $\gamma$  peuvent être déterminés à partir du spectre d'absorption de l'échantillon.  $\omega_0$  correspond à la pulsation au maximum d'absorption, et  $\gamma$  à la largeur du pic d'absorption.

Il est ensuite possible d'introduire une anharmonicité pour chaque oscillateur avec le paramètre  $\beta$  identique pour chacun. On tiendra compte des termes d'ordre 2 et d'ordre 1 dans le premier terme linéaire dans l'expression I.B-49 et on ne considérera que le terme d'ordre 1 dans la partie non linéaire. En cherchant les termes oscillants à  $2\omega$ , on obtient le système suivant (en ne considérant pas le développement spatial du champ incident faisant apparaître les termes non locaux) :

$$\begin{cases} D_{2\omega} a^{(2)} + \kappa b^{(2)} = -\beta(a^{(1)})^2 \end{cases} \quad (\text{I.B-57})$$

$$\begin{cases} \kappa a^{(2)} + D_{2\omega} b^{(2)} = -\beta(b^{(1)})^2 \end{cases} \quad (\text{I.B-58})$$

Dans ce dernier système, nous vérifions qu'en l'absence d'effet quadratique dans la force de rappel ( $\beta=0$ ), il n'y a plus d'élongation non linéaire ( $a^{(2)}$  ou  $b^{(2)} = 0$ ).

A partir des deux systèmes précédents, il est possible de calculer les expressions du moment dipolaire électrique et magnétique en introduisant les solutions dans l'expression I.B-59 :

$$\underline{p}^{(2)} = \begin{pmatrix} -ea^{(2)} \cos \alpha \\ -eb^{(2)} \cos \alpha \\ -e(b^{(2)} - a^{(2)}) \sin \alpha \end{pmatrix} \quad (\text{I.B-59}).$$

En se plaçant loin de la résonance à un photon ( $\omega = \omega_0$ ), il est possible de négliger  $\kappa$  par rapport à  $D_\omega \approx \omega_0^2$  et de calculer les composantes du tenseur hyperpolarisabilité d'origine dipolaire électrique.

$$\beta_{xxx}^{eee} = \beta_{yyy}^{eee} = \frac{\beta e^3 \cos^3 \alpha}{\epsilon_0 m^2 D_\omega^2 D_{2\omega}} \quad (\text{I.B.60})$$

$$\beta_{xxy}^{eee} = \beta_{xyx}^{eee} = \beta_{yxy}^{eee} = \beta_{yyx}^{eee} = -\frac{\beta e^3 \kappa \cos^3 \alpha}{\epsilon_0 m^2 D_\omega^3 D_{2\omega}} \quad (\text{I.B-61})$$

$$\beta_{xxz}^{eee} = \beta_{xzx}^{eee} = -\beta_{yyz}^{eee} = -\beta_{yzx}^{eee} = \beta_{zxz}^{eee} = -\beta_{zyy}^{eee} = -\frac{\beta e^3 \cos^2 \alpha \sin \alpha}{\epsilon_0 m^2 D_\omega^2 D_{2\omega}} \quad (\text{I.B-62})$$

$$\beta_{xzz}^{eee} = \beta_{zxz}^{eee} = \beta_{zzx}^{eee} = \beta_{yzz}^{eee} = \beta_{zyz}^{eee} = \beta_{zzy}^{eee} = \frac{\beta e^3 \cos \alpha \sin^2 \alpha}{\epsilon_0 m^2 D_\omega^2 D_{2\omega}} \quad (\text{I.B-63})$$

$$\beta_{xyy}^{eee} = \beta_{yxx}^{eee} = -\frac{\beta e^3 \kappa \cos^3 \alpha}{\epsilon_0 m^2 D_\omega^2 D_{2\omega}^2} \quad (\text{I.B-64})$$

$$\beta_{xyz}^{eee} = \beta_{xzy}^{eee} = -\beta_{yxz}^{eee} = -\beta_{yzx}^{eee} = \frac{\beta e^3 \kappa \cos^2 \alpha \sin \alpha}{\epsilon_0 m^2 D_\omega^3 D_{2\omega}^2} (D_{2\omega} - D_\omega) \quad (\text{I.B-65})$$

$$\beta_{zxy}^{eee} = \beta_{zyx}^{eee} = \beta_{zzz}^{eee} = 0 \quad (\text{I.B-66})$$

En l'absence de couplage entre les oscillateurs ( $\kappa=0$ ), il n'est plus possible de rendre compte d'une chiralité pour l'édifice formé par les deux oscillateurs. On identifie ainsi les composantes tensorielles qui dépendent de  $\kappa$  comme des composantes non nulles seulement pour des molécules chirales (composantes « chirales »). Les composantes indépendantes de  $\kappa$  sont donc appelées « achirales ».

Ces composantes doivent ensuite être moyennées sur les directions autorisées par les liaisons. (dans l'exemple de l'ASTB traité au chapitre III, seul l'angle  $\varphi$  sera aléatoire). Le groupe de symétrie  $C_\infty$  laisse la surface invariante, on peut se rapporter au tableau I)B.1 pour connaître les coefficients du tenseur susceptibilité non nuls ( $zzz$ ,  $zxx=zyy$ ,  $xxz=xzx=yyz=yzy$  pour les coefficients achiraux et  $xyz=xzy=-yxz=-yzx$  pour les termes chiraux).

D'après les expressions I.B-60, 62 et 63, nous pouvons prédire que les termes « achiraux » auront une dépendance fréquentielle du type :

$$\chi_{\text{achiraux}}^{\text{eee}} \propto \beta \frac{1}{D_\omega^2 D_{2\omega}} \quad (\text{I.B-67}).$$

Nous retrouvons dans cette dernière expression la génération de second harmonique du fait de l'anharmonicité du potentiel avec lequel interagissent les électrons (proportionnel à  $\beta$ ).

Les termes chiraux vont varier comme :

$$\chi_{\text{chiraux}}^{\text{eee}} \propto \beta \kappa \frac{D_{2\omega} - D_\omega}{D_\omega^3 D_{2\omega}^2} \rightarrow f_s, h_p \quad (\text{I.B-68}).$$

La présence de la constante de couplage témoigne de la sensibilité de ce terme à la chiralité des molécules.

Lorsque l'on s'éloigne des résonances,  $\chi_{\text{chiraux}}^{\text{eee}}$  tend vers zéro, alors que ce n'est pas le cas pour la composante achirale. Ce résultat n'est pas limité au cas des molécules chirales, nous retrouvons, en effet, loin des résonances, la symétrie des tenseurs de Kleinman, qui impose l'invariance des composantes tensorielles dans la permutation des 3 indices. Cette permutation change également le signe de la composante d'après le tableau I)B.1. Pour satisfaire à ces deux conditions, les composantes chirales (possédant trois indices distincts) s'annulent loin des résonances [Mesnil, 2001].

A partir des susceptibilités, il est alors possible d'en déduire la polarisation  $P$  et ensuite le champ électrique rayonné à  $2\omega$  à partir de l'expression I.B-16 (en prenant une aimantation et une quadrupolarisation nulle). Il est possible d'en déduire les coefficients  $f, g$  et  $h$  et de retrouver les valeurs d'ORD en fonction de la longueur d'onde [Kauranen, 1998] ; [Schanne, 1998].

Si la surface était isotrope, si les angles  $\psi$  et  $\theta$  pouvaient prendre n'importe quelle valeur, alors le moyennage sur la surface nous conduirait à obtenir une susceptibilité d'ordre 2 non nulle, d'origine dipolaire électrique, ne contenant que des termes chiraux provenant seulement de  $\beta_{123}^{eee}$ . Les termes achiraux proviendraient alors des contributions dipolaires magnétiques (non locales) [Hache, 2001], et ne seraient pas présents dans les termes locaux. Ce résultat surprenant est dû à la très grande symétrie du système. Il est plus raisonnable de considérer une géométrie non isotrope qui permet de retrouver des termes achiraux dipolaires électriques, plus conformes à la réalité.

Dans ce modèle, nous considérons justement les angles  $\psi$  et  $\theta$  comme fixes. Nous voyons ainsi apparaître des contributions achirales sans avoir à considérer une interaction non locale avec le champ incident, elles sont d'origine dipolaire électrique. Les composantes chirales sont également d'origine locale et dipolaire électrique.

Etant donné que les termes non locaux sont en rapport  $d/\lambda$  avec les composantes locales, l'ordre de grandeur de  $d$  est d' $1\text{\AA}$  alors que celui de la longueur d'onde est 4 ordres de grandeur supérieur, il est légitime de considérer uniquement les termes locaux dans notre calcul.

Les expériences d'ORD et de LD étant sensibles surtout aux contributions chirales locales, les valeurs attendues de LD et  $\Phi_{mp}$  seront non nulles.

Les expériences conduites au chapitre III seront le moyen de valider ce modèle introduit d'oscillateurs couplés. Ce modèle permettra de retrouver de façon qualitative et quantitative les résultats expérimentaux obtenus sur un film de molécules chirales.

## Conclusion :

Il apparaît clairement à la vue de ces résultats, que l'utilisation d'un diagnostic polarimétrique non linéaire doit nous permettre d'accéder au type d'interaction mis en jeu (locale ou non locale). Les valeurs d'ORD et de LD seront non nulles pour des molécules décrites par le modèle de Kuhn (origine locale dipolaire électrique), alors que celles correspondant au modèle de Kauzmann présenteront seulement une valeur de CD différente de zéro (origine non locale dipolaire magnétique et quadrupolaire électrique). Le type de chiralité (par couplage excitonique ou par mouvement des charges hélicoïdal) peut être identifié. Cette démarche nous donne donc accès à la compréhension des mécanismes microscopiques impliqués dans la chiralité. Par contre, les deux modèles présentés ici présentent des modes d'interactions avec le champ extérieur extrêmement simples. En effet, une molécule ne possède pas seulement deux moments dipolaires, mais un nombre beaucoup plus grand. Considérer une interaction entre deux oscillateurs peut dès lors sembler simpliste. Il faudrait pour être plus quantitatif dans nos prédictions, considérer de nombreux termes de couplages. Cependant, cette démarche basée sur ces modèles phénoménologiques simples, représentent déjà assez fidèlement nos résultats expérimentaux, comme nous pourrons le vérifier dans la dernière partie du chapitre III. Ce chapitre sera l'occasion de valider le modèle d'oscillateurs anharmoniques couplés.

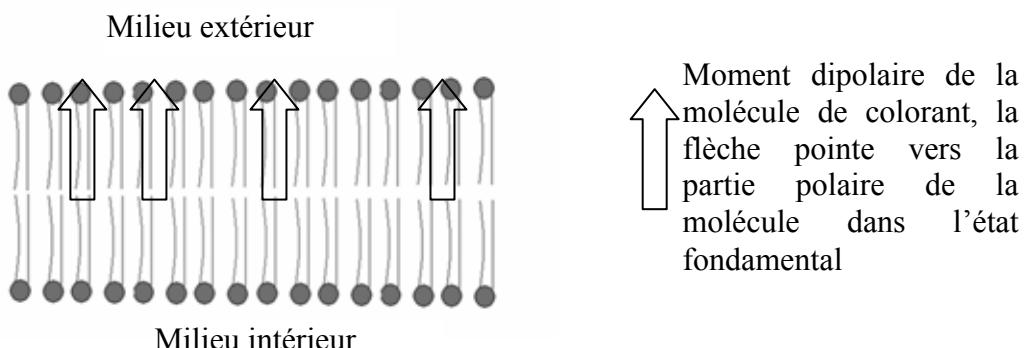
## I. C) Conception de colorants membranaires

Nous avons cherché à mettre au point un nouveau type de colorant membranaire optimisé pour la SHG. Cette construction est un travail long car il y a beaucoup de paramètres à étudier (solubilité, efficacité, affinité membranaire, etc,...). De nombreuses directions peuvent être empruntées pour mener à bien cette conception, et nous avons choisi d'explorer une voie en particulier : celle de la chiralité des colorants. En s'appuyant sur des travaux préliminaires [Campagnola, 1999] utilisant des colorants chiraux membranaires, notre compréhension des mécanismes impliqués doit nous permettre de choisir quel type de chiralité précisément doit être utilisée (par couplage excitonique ou par centre asymétrique). Cette étude fera l'objet du premier point. Ensuite, dans la partie ii nous détaillerons les caractéristiques générales que doit posséder un marqueur membranaire.

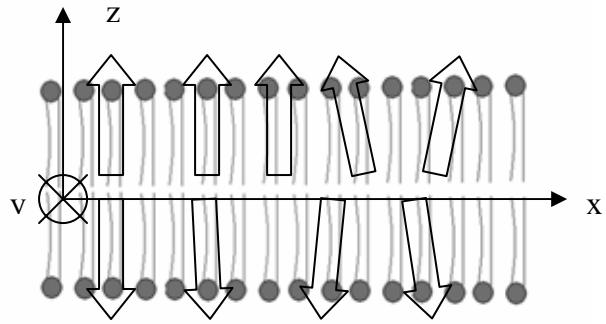
### i. Chiralité des colorants membranaires

- Position du problème :

La plupart des colorants une fois dans la membrane diffusent très rapidement de part et d'autre de celle-ci. La membrane est une bicouche lipidique (cf. partie D du chapitre II). Il y a donc une transition rapide entre la situation décrite sur la figure I)C.1 et celle décrite la figure I)C.2 (pour des colorants représentés par un seul moment dipolaire).



**Figure I)C.1 :** insertion membranaire d'un colorant avant diffusion du colorant à l'intérieur de la cellule.



**Figure I)C.2 :** arrangement des molécules de colorants de part et d'autre de la membrane après diffusion. L'axe ( $Oy$ ) est normal au plan de la figure.

Lorsque le colorant s'insère comme dans le cas de la figure I)C.2, il en résulte un arrangement centrosymétrique des molécules. En l'absence de champ membranaire statique, et malgré des sections efficaces de diffusion du signal de second harmonique importantes, le signal de SHG s'annule dans l'approximation dipolaire électrique. Nous allons détailler ce point. Les termes non nuls achiraux d'origine dipolaire électrique pour chaque monocouche sont :

$$\chi_{zzz}^{eee}, \chi_{zxx}^{eee} = \chi_{zyy}^{eee}, \chi_{xxz}^{eee} = \chi_{xzx}^{eee} = \chi_{yyz}^{eee} = \chi_{yzy}^{eee} \quad (\text{Tableau I)B.1}).$$

Les termes achiraux dipolaires magnétiques sont d'après le tableau I)B.1:

$$\chi_{xyz}^{eem} = -\chi_{yxz}^{eem}, \chi_{xzy}^{eem} = -\chi_{yzx}^{eem}, \chi_{zxy}^{eem} = -\chi_{zyx}^{eem} \text{ et } \chi_{xyz}^{mee} = \chi_{xzy}^{mee} = -\chi_{zxy}^{mee} = -\chi_{yzx}^{mee}$$

Pour passer d'une monocouche à l'autre, il faut effectuer une rotation de  $180^\circ$  d'axe ( $Ox$ ). Cette transformation change  $y$  et  $z$  en leur opposée et  $x$  reste invariant. Les composantes tensorielles achirales dipolaires électriques de chaque monocouche sont de signe opposé. Les composantes achirales de chaque monocouche d'origine dipolaire magnétique agissant sur le champ magnétique, sont de même signe [Kauranen, 1998]. Pour l'ensemble de la bicoche il faut sommer les composantes de chaque monocouche. Après diffusion, il est raisonnable de penser que les termes de chaque monocouche ont la même importance.

Les différents termes achiraux dipolaires électriques vont alors se retrancher, et les termes achiraux d'origine dipolaire magnétique vont s'ajouter. Les molécules possédant souvent un moment dipolaire magnétique de faible valeur, la somme prendra une valeur négligeable. Il sera alors très difficile d'observer la membrane en l'absence de champ transmembranaire.

- Apport de la chiralité du colorant :

Le signal de SHG ne s'annule pas si les molécules du colorant sont sous forme d'un énantiomère et sont donc chirales. Le milieu, dans ce cas, n'est plus centrosymétrique.

Il est possible d'écrire la susceptibilité pour la bicouche en séparant les contributions chirales et achirales :

$$\underline{\underline{\chi}}_{\text{eff}}^{(2)}(\omega, \omega) = \underline{\underline{\chi}}_{\text{chiral}}^{(2)}(\omega, \omega) + \underline{\underline{\chi}}_{\text{achiral}}^{(2)}(\omega, \omega) \quad (\text{I.C-1}).$$

Dans l'expression I.C-1, le terme achiral correspond aux termes dipolaires électriques et magnétiques vus dans le point précédent. Le terme chiral dipolaire électrique est également donné par le tableau I)B.1, ses composantes sont :

$$\chi_{xyz}^{eee} = \chi_{xzy}^{eee} = -\chi_{yxz}^{eee} = -\chi_{yzx}^{eee}$$

Les termes chiraux d'origine magnétiques sont :

$$\chi_{zzz}^{eem}, \chi_{zxx}^{eem} = \chi_{zyy}^{eem}, \chi_{xxz}^{eem} = \chi_{yyz}^{eem}, \chi_{xzx}^{eem} = \chi_{yzy}^{eem}$$

$$\text{et } \chi_{zzz}^{mee}, \chi_{zxx}^{mee} = \chi_{zyy}^{mee}, \chi_{xxz}^{mee} = \chi_{xzx}^{mee} = \chi_{yyz}^{mee} = \chi_{yzy}^{mee}$$

Lors de la rotation d'axe (Ox), pour passer d'une monocouche à l'autre, les composantes chirales dipolaires électriques restent invariantes. Les composantes chirales dipolaires magnétiques sont par contre transformées en leurs opposées. La susceptibilité chirale résultante pour l'ensemble de la bicouche est alors non nulle. Elle est d'origine dipolaire électrique puisque ces composantes chirales s'ajoutent constructivement à la différence des composantes chirales dipolaires magnétiques qui se retranchent. Un signal de SHG pourra ainsi provenir de la membrane en l'absence de champ électrique membranaire si le colorant utilisé est chiral et si la chiralité provient d'un effet dipolaire électrique. Ce sera le cas de colorants ayant une chiralité par couplage excitonique et non par centre asymétrique. Les colorants décrits par le modèle de Kuhn, possèdent une chiralité résultant d'un couplage excitonique entre oscillateurs, cette chiralité est alors d'origine dipolaire électrique, ce sont elles qui retiennent notre attention pour ce travail. Les molécules possédant un ou plusieurs

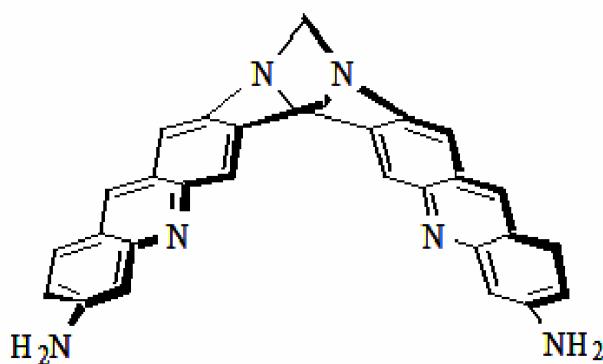
atomes de carbone asymétriques sont décrits par le modèle de Kauzmann, leur chiralité provient d'un mouvement hélicoïdal des charges, elle est d'origine dipolaire magnétique.

Ce dernier type de colorant a été utilisé par Lewis et al. [Campagnola, 1999], exhibant expérimentalement une exaltation par un facteur 2 du signal de SHG du fait de la chiralité par centre asymétrique. Ce facteur est faible mais surprenant pour ce type de chiralité.

Conclusion :

Les molécules décrites par un couplage excitonique, trouvent l'origine de leur chiralité dans des effets locaux dipolaires électriques. Cela nous permet de prédire un  $\chi_{\equiv chiral}^{(2)}$  non nul pour une géométrie où le colorant est inséré de part et d'autre de la membrane.

Cette idée constitue le point de départ de notre travail expérimental, durant lequel nous avons étudié un premier prototype de molécule chirale présentant, à priori, un couplage excitonique : l'ASTB (figure I)C.3). Nous avons tout d'abord cherché à caractériser ses propriétés optiques non linéaires, en mesurant le signal de second harmonique qu'elle génère en surface. Puis, nous avons testé ses caractéristiques comme marqueur membranaire biologique. L'ensemble de ces résultats sera présenté au chapitre III.



**Figure I)C.3 :** formule semi développée de l'ASTB (ici l'énanthiomère (-)7R,17R).

Nous allons présenter les autres caractéristiques que doit posséder un colorant pour l'imagerie non linéaire de membranes cellulaires.

## ii. Caractéristiques

Un colorant membranaire pour l'imagerie non-linéaire doit posséder de nombreuses propriétés comme une solubilité dans les milieux physiologiques et les membranes biologiques, sans pour autant être toxique pour les cellules. Une fois inséré dans les membranes, le colorant doit pouvoir émettre un signal de SHG suffisamment intense pour être détecté. Il peut être intéressant de visualiser un signal de TPEF, pour nous aider à caractériser le colorant (orientation membranaire par exemple). Certains colorants sont sensibles à la présence d'ions dans le milieu. Ils possèdent un ou plusieurs groupements récepteurs spécifiques d'un ion, et modifie ainsi la répartition des charges dans la molécule de colorant suivant la présence ou non de l'espèce chargée. Le signal de SHG ou de fluorescence peut voir son intensité varier avec la concentration d'un ion (la quantité de molécules de colorant ayant réagi varie avec la concentration en ion), ou son spectre d'émission peut changer. Il est alors possible de réaliser de l'imagerie fonctionnelle. Elle procure non seulement des informations sur la morphologie des objets étudiés et elle permet aussi de corrélérer cette information au mode de fonctionnement impliqué.

- Insertion membranaire :

Une propriété de tout colorant membranaire est de pouvoir se fixer dans les membranes des constituants biologiques. Ces membranes sont constituées d'une bicouche lipidique, le colorant doit donc posséder une affinité soit pour les groupements polaires des phospholipides, soit pour leurs chaînes carbonées. Pour cela, les molécules de colorant possèdent souvent à une de leur extrémité des chaînes carbonées. Ces chaînes seront attirées par celles des phospholipides pour assurer ainsi la fixation du colorant dans la membrane.

Ce point est également important, car pour la SHG, l'orientation relative des molécules, entre elles et par rapport au champ incident, est déterminant pour l'intensité du signal généré.

Dans l'exemple d'un colorant de TPEF, son affinité pour la membrane doit être supérieure à celle pour le milieu extérieur. Sinon, le signal observé provenant du milieu extérieur aux membranes sera plus intense.

- Solubilité dans la préparation :

Pour que le colorant se fixe à la membrane, il doit pouvoir être mis en contact avec elle. Pour cela il doit être soluble dans le milieu contenant les cellules. Ce milieu est toujours aqueux et il s'agit souvent d'un liquide physiologique de pH proche de 6, contenant plusieurs espèces chargées.

La solubilité du colorant dans la solution contenant des cellules est souvent antagoniste de sa forte affinité pour les chaînes aliphatiques des phospholipides. En effet, les chaînes aliphatiques ne sont constituées que d'atomes de carbone et d'hydrogène d'électronégativité très proche (2,2 pour l'hydrogène et 2,55 pour le carbone sur l'échelle de Pauling) les liaisons sont donc très peu polarisées. Nous avons vu que certains colorants possèdent des chaînes carbonées très peu polaires, qui n'ont donc aucune affinité pour l'eau qui elle, est au contraire très polaire (électronégativité de l'oxygène : 3,44). Les colorants ayant une grande affinité pour les membranes à cause de leurs chaînes carbonées risquent de ne pas être solubles en milieu aqueux.

Afin de pouvoir solubiliser le colorant dans une solution aqueuse contenant les cellules, il faut utiliser un agent de transfert de phase. Le colorant initialement sous forme solide, forme un complexe avec cet agent qui lui est soluble en milieu aqueux. Cette méthode ne fonctionne que si le colorant possède une plus forte affinité pour la membrane que pour le complexe qui a permis de le solubiliser. Plusieurs exemples d'agent de transfert de phase existent, la cyclodextrine en est un exemple [Moreaux, 2002].

- Non toxicité :

La solubilité des colorants dans l'éthanol ou le DMSO, est inutilisable en Biologie. Ces solvants engendrent la destruction des cellules, par choc osmotique ou par solubilisation de la membrane.

Le colorant lui-même ne doit pas présenter de toxicité aux quantités impliquées pour la coloration. Il ne doit pas perturber le comportement de la cellule. Il faut donc s'assurer que le colorant ne constitue pas un poison pour la cellule étudiée.

La toxicité peut provenir également d'une forme radicalaire du colorant après son excitation par le champ incident.

La cellule est un environnement tellement complexe qu'il n'est pas possible de prédire à priori la toxicité d'une molécule à la simple vue de sa formule semi développée. Il est donc nécessaire de tester sa toxicité. Il est, par exemple, possible de contrôler le potentiel d'action de cellules excitables en présence du colorant. Un contrôle de la morphologie des cellules colorées est un test simple qui peut mettre évidence un effet toxique.

- Efficacité de SHG :

Une fois le colorant dans la membrane celui-ci doit pouvoir générer un signal suffisamment intense pour être détecté. Le rendement de SHG doit être assez important pour pouvoir travailler avec des puissances incidentes sans dommage pour les objets biologiques. Pour que le colorant soit également utilisable en fluorescence excitée à deux photons, il faut optimiser soit l'hyperpolarisabilité d'ordre 2 ( $\gamma$  pour la TPEF). L'intensité du signal de second harmonique est donnée par la formule I.A-18, où l'on peut considérer seulement  $\beta_{zzz}$  pour un dipôle aligné dans la direction de la polarisation du champ électrique incident. Cette composante de l'hyperpolarisabilité d'ordre 1 est donnée par (pour un système avec un niveau d'énergie fondamental et un seul état excité) [Shen, 1984]:

$$\beta_{zzz} = \frac{3e^2}{2\hbar^3} f \Delta\mu \frac{\omega_0}{(\omega_0^2 - 4\omega^2)(\omega_0^2 - \omega^2)} \quad (\text{I.C-2}).$$

Avec  $f$  la force d'oscillateur,  $\omega_0$  la pulsation de la transition entre l'état fondamental et l'état excité,  $\omega$  la pulsation du photon incident. Le paramètre de transfert de charges  $\Delta\mu$ , correspond à la différence entre les moments dipolaires dans l'état excité et dans l'état fondamental. Un colorant de SHG doit donc posséder un paramètre de transfert de charges ( $\Delta\mu$ ) optimisé.

Afin d'optimiser  $\Delta\mu$ , une des voies explorées est de fixer à une extrémité de la molécule un groupement donneur d'électron et à l'autre extrémité un groupement accepteur (comme un atome d'azote chargé positivement). Le passage des charges d'un groupement à l'autre étant assuré par la délocalisation d'électrons dans des orbitales  $\pi$  à travers des cycles coplanaires (ou toute configuration permettant la délocalisation d'électrons  $\pi$ , comme une alternance de liaisons doubles et simples entre atomes de carbone). Le groupement donneur (groupement amine, groupement hydroxyle par exemple) possède souvent un doublet d'électrons non liant

qui peuvent être délocalisés. Le groupement accepteur est souvent un atome chargé positivement dans les cycles (un atome d'azote par exemple).

Nous rappelons que l'optimisation du colorant pour la génération de second harmonique doit être menée en parallèle de l'étude de son insertion membranaire. En effet, une molécule peut très bien posséder un paramètre de transfert de charges important, mais collectivement, l'ensemble des molécules insérées dans les membranes peut s'avérer très peu efficace pour la SHG. Plus précisément le passage de l'hyperpolarisabilité ( $\beta$ ) à la susceptibilité d'ordre 2 ( $\chi$ ), se fait par l'intermédiaire d'un moyennage orientationnel (expression I.A-), à travers lequel certaines composantes de  $\beta$  vont se moyenner à zéro.

- Sensibilité au potentiel :

Afin de pouvoir utiliser un colorant pour l'imagerie de membranes biologiques, il serait pertinent que le colorant puisse nous apporter une information sur le fonctionnement de la cellule.

Il peut être intéressant que l'intensité du signal de SHG soit sensible au potentiel membranaire. Cette quantité est variable avec la valeur du champ électrostatique présent (environ  $10^5 \text{ V/cm}$ ). Il est possible de rendre compte de la sensibilité au potentiel de la susceptibilité d'ordre 2, en l'écrivant sous la forme d'une susceptibilité effective [Campagnola, 2002], [Campagnola, 1999], [Dombeck, 2004] :

$$\underline{\underline{\chi}}_{\text{eff}}^{(2)}(\omega, \omega) = \underline{\underline{\chi}}^{(2)}(\omega, \omega) + \underline{\underline{\chi}}^{(3)}(\omega, \omega, 0) \underline{E}_{\text{transmembranaire}}$$

La sensibilité du signal de second harmonique au potentiel peut avoir trois origines [Bouevitch, 1993], [Mertz, 2002]. La première est que suivant l'intensité du champ statique, les molécules de colorant peuvent se réorienter au sein de la membrane. Elles interagiront de façon différente avec le champ électrique incident qui possède une certaine polarisation. Une seconde origine peut venir d'une redistribution spatiale dans la bicouche des molécules de colorant avec le potentiel membranaire, l'environnement des molécules étant modifié. La troisième cause peut être une perturbation des transitions électroniques au sein du colorant. Le paramètre de transfert de charge est modifié par la présence du champ statique. Les moments

dipolaires dans les états fondamental et excité interagissent avec le champ statique. Ils peuvent être réduits ou augmentés suivant l'orientation du dipôle vis-à-vis de ce champ.

Cette sensibilité au champ électrostatique est bien sûr reliée à l'orientation du dipôle du colorant par rapport à la membrane. Ici encore, sensibilité au potentiel et insertion membranaire sont reliés.

A la vue de tous ces paramètres, nous pouvons évaluer toutes les difficultés à mettre au point un nouveau colorant. En effet, optimiser seulement une de ces caractéristiques ne fournit pas un colorant fonctionnel. Celui-ci peut être optimisé pour la SHG, mais son insertion membranaire peut être compromise car le chromophore ne disposerait pas de groupements pour le lier aux lipides. Notre démarche est de nous concentrer sur la chiralité du colorant qui constitue un point de départ pour ensuite optimiser ses autres caractéristiques. Il nous faut également démontrer expérimentalement l'exaltation du signal de SHG provenant du colorant chiral par couplage excitonique.

### **Conclusion du chapitre I :**

Nous avons vu que la SHG est un mode de contraste qui peut être utilisé en microscopie, et que la chiralité des molécules peut jouer un rôle important dans le cas de colorants membranaires. Mais certaines protéines peuvent aussi être utilisées comme source de contraste endogène dans les cellules, c'est le cas par exemple du collagène.

Nous avons montré que la visualisation d'une membrane biologique est possible en dehors de tout champ transmembranaire en utilisant un colorant chiral. L'utilisation de modèles simples pour décrire la chiralité des molécules, nous permet de prédire quel type de chiralité il faut utiliser : celle par couplage excitonique. Fort de cette information, il nous faut vérifier expérimentalement que la chiralité de l'ASTB provient bien d'un couplage excitonique. Il est possible de prévoir à partir des modèles quels seront les états de polarisation des signaux générés par un film de colorant chiral suivant leur type de chiralité. Nous pourrons donc effectuer ces expériences en surface sur l'ASTB afin de remonter au mécanisme de chiralité

mis en jeu. Le type de chiralité présent dans le collagène pourra également être diagnostiqué sur la même base. Afin de se placer dans les meilleures conditions d'observations possibles, et de caractériser complètement nos chromophores un certain nombre de mesures est nécessaire. Elles nécessitent une instrumentation qui sera détaillée au chapitre suivant.

## **Chapitre II**

### **Techniques expérimentales**

Ce chapitre présente les différents outils expérimentaux intervenant dans ces recherches.

Afin d'avoir accès aux propriétés de fluorescence à deux photons des composées étudiées (ASTB et élastine), il a été nécessaire de concevoir et réaliser un spectrofluorimètre. La première partie présente cet instrument qui permet d'étudier le spectre de fluorescence dans le cas d'une excitation non linéaire, et de connaître le spectre d'excitation à deux photons des différents chromophores.

Nous présentons, dans la partie B, le montage d'analyse du signal de SHG produit par un film déposé sur un substrat. Nous précisons les éléments optiques utilisés pour l'analyse de la polarisation et la méthode de détection du signal de SHG. Cette technique introduite au Laboratoire depuis quelques années, doit être parfaitement maîtrisée pour s'affranchir d'éventuels artéfacts pouvant fausser l'interprétation des résultats expérimentaux.

Dans la partie C, le fonctionnement et les caractéristiques du microscope à balayage développé au sein de l'équipe « Imagerie fonctionnelle » du Laboratoire sont résumés. Cet instrument a permis d'obtenir les résultats contenus dans les chapitres III et IV.

Enfin, dans la dernière partie, nous expliquons comment synthétiser des vésicules unilamelaires géantes mimant les membranes plasmiques. Cette technique expérimentale a fait l'objet d'un développement particulier pour étudier l'insertion membranaire des colorants.

Nous présenterons donc en détail les différents éléments techniques introduits.

## II) A. Spectrofluorimètre à deux photons

### i. Principe de fonctionnement

Comme il a été indiqué dans la partie A du chapitre I, la connaissance de la section efficace de fluorescence excitée à deux photons ( $\sigma_{\text{fluo}}^{(2)} = \eta \cdot \sigma^{(2)}$ ) est essentielle pour caractériser un fluorophore pour la microscopie non linéaire. Pour étudier un nouveau colorant, nous allons procéder par comparaison avec un étalon, la fluorescéine, dont on connaît le produit  $\sigma_{\text{fluo}}^{(2)}$  à pH=11.

Cet instrument permet d'étudier la dépendance de  $\sigma_{\text{fluo}}^{(2)}$  avec la longueur d'onde. Nous en déduirons les conditions d'excitation optimales du colorant impliqué. Il permet également de mesurer le spectre d'émission du colorant. Nous pourrons ainsi optimiser les conditions spectrales d'observation.

Le principe de fonctionnement du spectrofluorimètre, présenté sur la figure II)A.1 est le suivant :

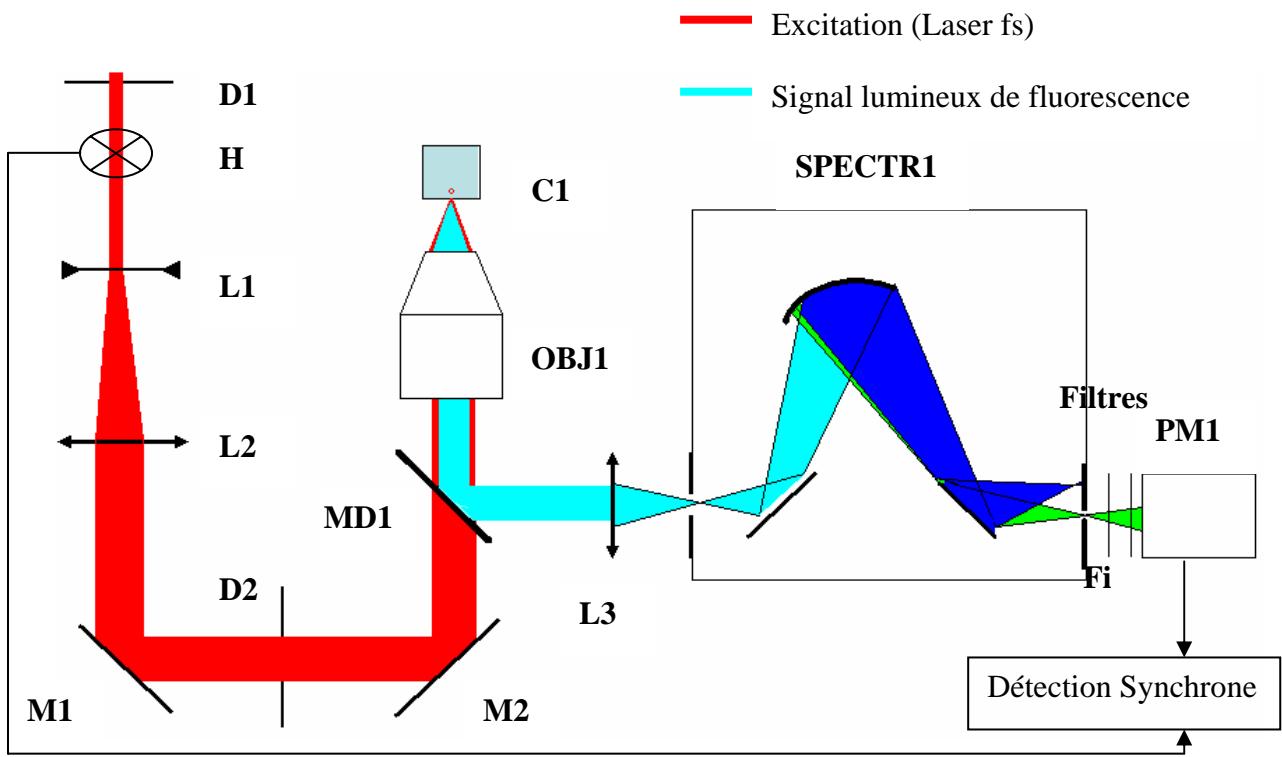
un faisceau lumineux issu d'un oscillateur titane saphir (Tsunami de Spectra Physics pompé par un Millenia 5W) traverse un miroir dichroïque (MD1) pour être focalisé par l'intermédiaire d'un objectif de microscope (OBJ1) dans une cuve (C1) contenant le colorant. Ce même objectif collecte la lumière émise vers l'arrière par l'échantillon. Ce signal est réfléchi par le miroir dichroïque. Il est ensuite focalisé par la lentille L3, soit sur la fente d'entrée du monochromateur (SPECTR1), soit directement sur le détecteur (PM1). En utilisant les filtres adéquats, il est possible de séparer le signal de fluorescence des réflexions (SPECTR1 est alors enlevé du montage et L3 et PM1 translatés).

Le faisceau provenant du laser est élargi par les lentilles L1 et L2 afin qu'il couvre complètement la pupille d'entrée de l'objectif. Ainsi, le volume d'excitation aura une taille minimale déterminée par les propriétés de l'objectif (cf partie résolution, au II)C).

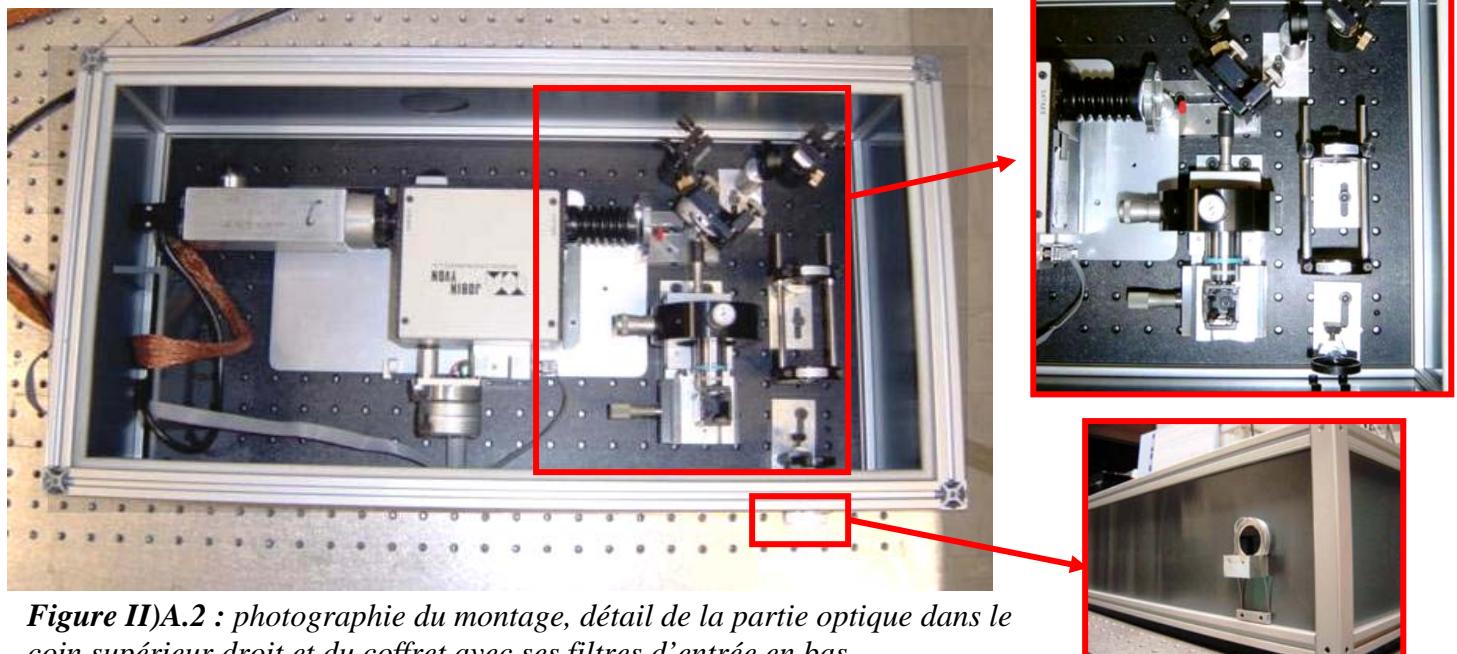
Le monochromateur est motorisé et permet au besoin d'obtenir le spectre du signal de fluorescence émis par le colorant. Il faut pour cela tenir compte des réponses spectrales des différents éléments traversés par ce signal (OBJ1, MD1, L3, SPECTR1, Fi, PM1).

En cas d'absence du monochromateur, tout le signal de fluorescence collecté est directement envoyé sur le détecteur. Une étude de l'intensité du signal de fluorescence intégrée spectralement est alors possible en faisant varier la longueur d'onde du laser incident accordable, ce qui permet ainsi d'accéder au spectre d'excitation du fluorophore.

La détection synchrone faisant intervenir un photomultiplicateur Hamamatsu à très faible bruit est identique à celle détaillée dans la méthode 1 de la partie B de ce chapitre.



**Figure II)A.1 :** Principe de fonctionnement du spectrofluorimètre à deux photons, la lumière excitatrice provenant du laser Ti :Saphir est représentée en rouge, la fluorescence en turquoise (bleu et vert).



**Figure II)A.2 :** photographie du montage, détail de la partie optique dans le coin supérieur droit et du coffret avec ses filtres d'entrée en bas.

**D1,2** : diaphragmes **L1** : lentille divergente **L2** : lentille convergente **M1,2** : miroirs  
**MD1** : miroir dichroïque **OBJ1** : objectif de microscope **H** : hacheur optique  
**C1** : cuve de spectroscopie contenant le colorant **L3** : lentille convergente  
**SPECTR1** : monochromateur à réseau concave **Fi** : filtres spectraux  
**PM1** : photomultiplicateur.

## ii. Construction et caractéristiques

L'instrument (figure II)A.2) a été conçu dans un souci de compacité et de mobilité. En effet, en changeant au besoin le miroir dichroïque MD1, il peut effectuer des mesures dans des gammes spectrales variées. Il est alors nécessaire de le coupler à diverses sources lumineuses. Il doit donc pouvoir venir s'installer aux côtés de différentes sources déjà en place. Pour cela, un télescope peut être utile et n'est pas représenté sur la figure II)A.1. L'ensemble du montage est installé sur une plaque rigide pré percée de 50cmX30cm. Il est capoté pour être hermétique à la lumière extérieure. Devant le premier diaphragme D1 il est possible d'insérer divers filtres pour limiter l'intensité du faisceau incident.

Ceci est important car il s'agit de ne pas saturer l'absorption du produit à caractériser. Pour s'en assurer, il faut se placer à deux puissances de part et d'autre de celle sélectionnée et vérifier que l'intensité de fluorescence détectée varie comme le carré de la puissance excitatrice. Enfin, il faut se placer dans une zone de détection linéaire du photomultiplicateur, on pourra pour cela utiliser des filtres atténuateurs (type NG de Schott).

Le choix des composants, tous ajustables en hauteur, est le suivant :

- **H** : hacheur optique tournant à 180tr/min, réglé en vitesse.
- **L1** : lentille divergente biconvexe de focale -20cm et de diamètre 20mm en silice fondu.
- **L2** : lentille convergente biconcave de focale +60cm et de diamètre 25mm en silice fondu. Ceci permet d'obtenir un grossissement de 4 fois nécessaire pour obtenir un faisceau de 8mm en sortie à partir d'un diamètre de faisceau incident de 2mm, la

pupille arrière de l'objectif étant de 6mm.

- **M1,2** : miroirs en argent 10mmX10mm.

Chacun d'entre eux est monté sur un support trait-point plan. Les miroirs ont un coefficient de réflexion de  $R=0,98$  à 700nm.

- **MD1** : miroir dichroïque 700 dcxru de diamètre : 25mm (Chroma).

Il est monté sur un support trait-point plan. La figure II)A.3 représente sa transmission spectrale.

- **OBJ1** : Olympus 20X LMPlan IR à air, O.N. : 0.4, distance de travail : 3mm.

Il est monté sur un support permettant de le déplacer suivant les 3 directions de l'espace permettant d'ajuster sa distance vis-à-vis de la cuve. La grande distance de travail est nécessaire pour traverser l'épaisseur de la paroi de la cuve (1mm), et satisfaire aux conditions d'encombrement des supports respectifs.

- **C1** : Cuve Helma QS. La cuve peut être translatée transversalement au faisceau.

- **L3** : lentille convergente plan concave de focale +10cm de diamètre 40mm en silice fondu. Elle est également montée sur un support lui permettant d'être alignée avec la fente d'entrée du monochromateur, ou l'axe du photomultiplicateur.

- **SPECTR1** : monochromateur Jobin Yvon, H10 vis, motorisé, utilisé entre 350nm et 800nm.

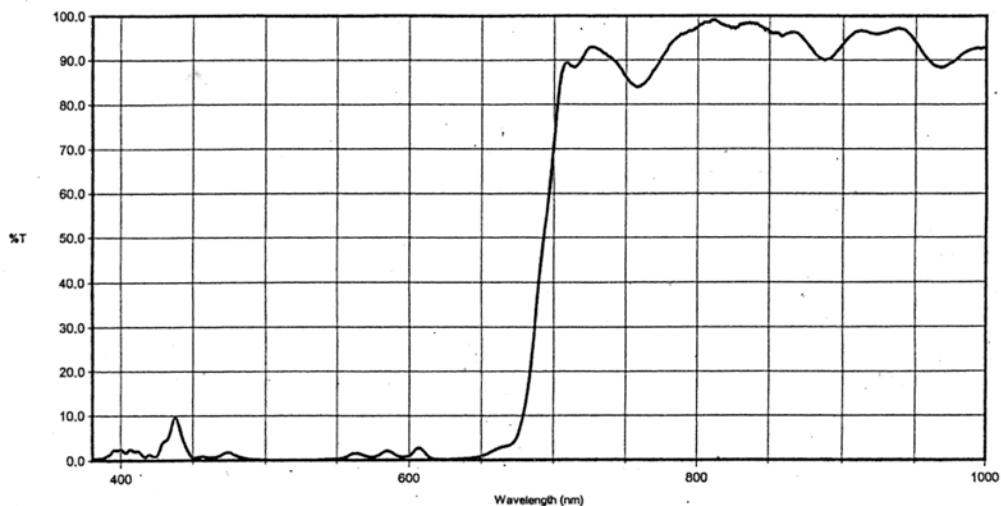
Les fentes d'entrée et de sortie peuvent être choisies parmi plusieurs dimensions, la résolution du monochromateur valant 1nm avec des fentes de 0,5mm pour une couverture complète du réseau. Une taille de fentes supérieure permet d'avoir un signal plus intense au détriment de la résolution.

- **PM1** : Hamamatsu H5783P.

Il est monté sur un support translatable qui permet de l'ajuster au monochromateur ou directement à la lentille. Il est alimenté par une tension de 950V (ajustable et fournie par une alimentation compacte à découpage) et fonctionne comme indiqué dans la méthode 1 employée dans la partie B de ce chapitre.

L'ensemble L3, SPECTR1 et PM1 est monté sur une platine permettant de le centrer sur le miroir dichroïque. Un Manchon est installé entre L3 et SPECTR1 afin de pouvoir s'affranchir d'une partie de la lumière parasite présente dans le montage issue du laser ou du colorant.

L'instrument permet d'obtenir des spectres de fluorescence dans la gamme : 350nm à 700nm avec une résolution de 1nm.



**Figure II)A.3 :** Transmission (en %) du miroir dichroïque 700dcxru en fonction de la longueur d'onde (en nm).

### iii. Procédures de réglages

Nous allons décrire à présent la procédure de réglage lors de la première utilisation ou d'un changement d'un élément de l'instrument.

La base ne comporte initialement aucun élément.

1. L'ensemble des deux lentilles est solidaire d'un même support et L1 peut être translatée le long de l'axe optique pour ajuster sa position vis à vis de L2. L'ensemble peut se décaler transversalement au faisceau pour que celui-ci passe par le centre des lentilles, il peut également tourner pour que son axe soit colinéaire aux rayons incidents

Régler l'ensemble des deux lentilles L1 et L2 pour que les foyers image de la lentille L1 (divergente) et objet de L2 soient confondus. Le faisceau émergent doit alors être

parfaitement collimaté, aucune divergence ou convergence ne doit être observée entre la sortie du dispositif et une observation à plusieurs mètres de celui-ci. L1 et L2 ne doivent pas être présentes avant l'étape 5 suivante.

2. Installer le support de l'objectif et régler les vis micrométriques à mi-course. Régler le télescope extérieur et orienter l'instrument pour que le faisceau d'excitation passe au milieu du porte objectif. Vérifier que le trajet du faisceau reste alors dans un plan parallèle à celui sur lequel viendra reposer l'instrument.
3. Orienter de nouveau le support dans sa position finale (son plus petit côté le long du faisceau).
4. Installer en premier le miroir M1, translater son support pour que le faisceau se réfléchisse en son centre. Ajuster son orientation pour conserver un faisceau dans le même plan qu'incidentement.
5. Installer ensuite le miroir M2, translater son support pour que le faisceau se réfléchisse en son centre. Ajuster son orientation pour conserver un faisceau dans le même plan qu'incidentement.
6. Mettre en place la lame dichroïque MD1 correctement orientée et placée à  $45^\circ$  par rapport au faisceau incident.
7. Avant de mettre en place l'objectif dans son support, repérer sur un écran placé au bord de la base la position du faisceau. Placer ensuite l'objectif, le translater afin que la lumière émergente soit centrée sur la position précédente.
8. Ajouter l'ensemble des deux lentilles L1,2 de façon à ce que le faisceau passe par le centre de la première, les orienter de façon à ce qu'il soit ensuite positionné sur le centre de la seconde. Ajuster finement ensuite pour que la lumière soit toujours centrée sur la position repérée en 7.
9. Installer le photomultiplicateur PM1, le monochromateur SPECTR1 et ensuite la lentille L3 avec sa face plane vers la lame dichroïque MD1. Placer dans la cuve une solution de fluorescéine très concentrée. Ajuster la distance entre la cuve et l'objectif pour focaliser le faisceau à l'intérieur de la solution. Aligner MD1 et l'ensemble PM1, L3, SPECTR1 grâce à la vis de la platine de translation les supportant. Le signal de fluorescence doit être centré sur L3, et L3 doit être translaté jusqu'à obtenir une lumière focalisée sur la fente d'entrée du spectroscope. Placer le manchon protecteur entre L3 et SPECTR1.

10. Ajuster la position du monochromateur (dont le diaphragme est alors ouvert) pour qu'il soit en parfait contact avec la sortie du monochromateur (ajuster également le diamètre du diaphragme pour assurer une parfaite « étanchéité »).
11. Placer les diaphragmes D1,2, sur le trajet du faisceau. Les laisser ensuite dans une position où ils ne diaphragment pas le faisceau.
12. Pour utiliser le fluorimètre sans le monochromateur, ôter celui-ci et translater le photomultiplicateur et la lentille pour focaliser le signal de fluorescence sur le diaphragme alors fermé lié au photomultiplicateur. Ouvrir très légèrement celui-ci.

La procédure d'installation pour une utilisation ultérieure est la suivante :

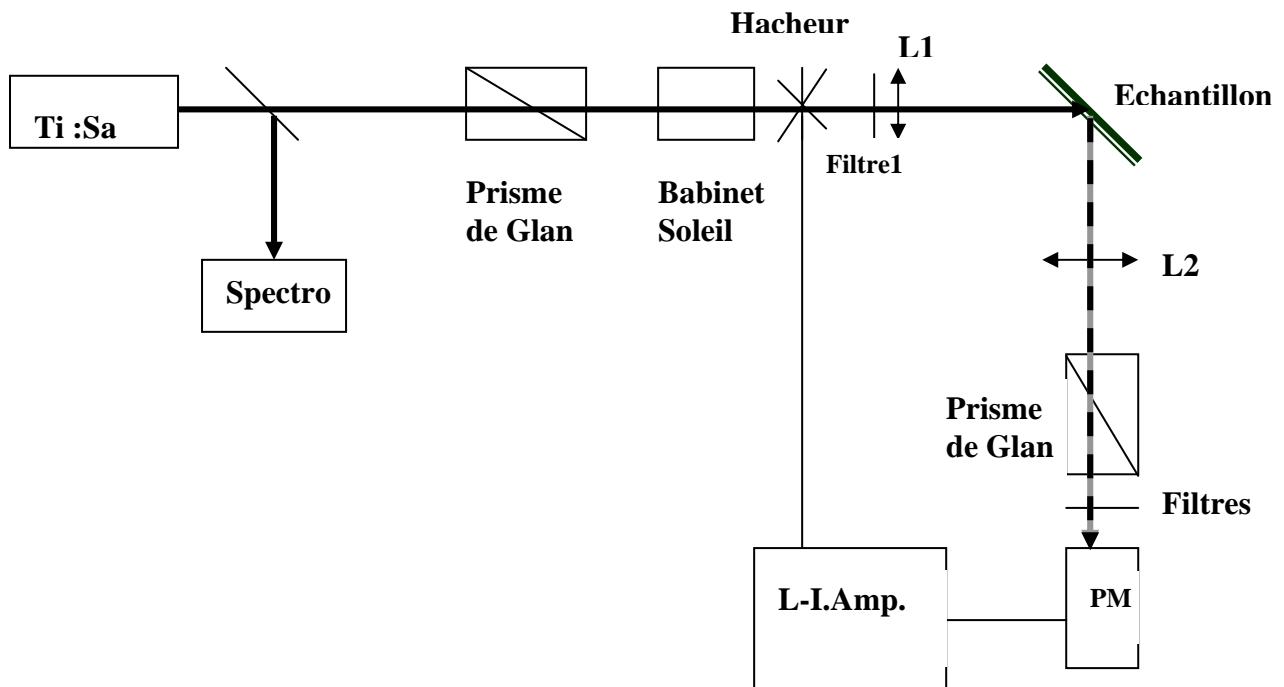
1. Placer approximativement l'instrument, et ajuster le périscope extérieur de façon à ce que le faisceau reste dans un plan parallèle à celui contenant l'instrument et qu'il passe par le premier diaphragme D1.
2. Orienter l'instrument pour que le faisceau passe par D2. Brider alors l'instrument.
3. Laisser D1 fermé sans qu'il diaphragme le faisceau incident.

## II) B. Expérience de génération de second harmonique résolue en polarisation

L'étude résolue en polarisation du signal de SHG réfléchi par un film mince de molécules chirales peut nous informer sur l'origine physique des processus mis en jeu. Cette étude est réalisée grâce au montage présenté ici.

### i. Montage Optique

Le montage représenté sur la figure II)B.1 représente l'ensemble des composants utilisés pour l'étude en polarisation du signal de second harmonique généré par un film mince moléculaire, qu'il s'agisse de colorant ou bien de molécule naturelle comme le collagène. La source utilisée est un oscillateur titane-saphir (Tsunami de Spectra Physics pompé par un Millénia 5W). L'oscillateur délivre des impulsions de 100fs, à une fréquence de répétition de 82MHz et à une puissance moyenne de 900mW à 800nm.



**Figure II)B.1 :** schéma optique correspondant au montage d'analyse polarimétrique du signal de second harmonique généré en surface par l'échantillon.

Afin de maîtriser précisément la polarisation  $p$  de la lumière excitatrice, le faisceau incident traverse un prisme de Glan. Celui-ci est adapté aux longueurs d'onde utilisées de 700nm à 1000nm. Le faisceau traverse ensuite un compensateur de Babinet-Soleil qui permet d'obtenir une lame retard variable. Une vis micrométrique permet d'ajuster la position d'un prisme par rapport à l'autre, la polarisation du faisceau incident peut ainsi être modifiée en utilisant les courbes d'étalonnage présentées aux figures II)B.1 et II)B.2. Le compensateur peut tourner autour de l'axe du faisceau qui le traverse. Un moteur pas à pas associé à un démultiplicateur permet ce mouvement avec un incrément minimum de 0,01°.

Le faisceau est modulé en amplitude grâce à un hacheur optique tournant typiquement à 160Hz. Un premier filtre rouge (Filtre1 : RG630) permet de filtrer la lumière ne correspondant pas à la gamme spectrale du laser. Le reste du montage est placé dans un boîtier hermétique à la lumière ambiante.

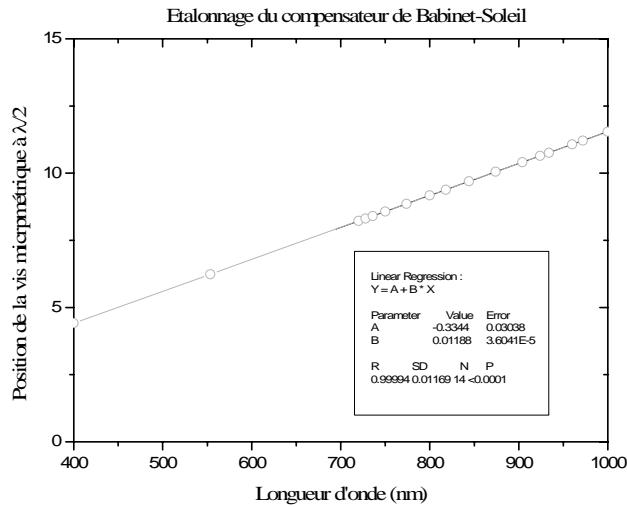
L'échantillon est un substrat de silice de 6mm d'épaisseur et de 25mm de diamètre, il est recouvert sur chacune de ses faces d'un film du colorant à étudier.

Une première lentille (L1) convergente de focale 100mm, 75mm ou 50mm permet de focaliser le faisceau à la surface de l'échantillon. L'intensité est un paramètre critique car le signal de second harmonique varie comme le carré de celle-ci, mais une intensité trop élevée détruira le film. Il faudra donc veiller à un choix approprié de la lentille qui permet un compromis optimal entre une intensité du signal de SHG suffisante et une non dégradation du film.

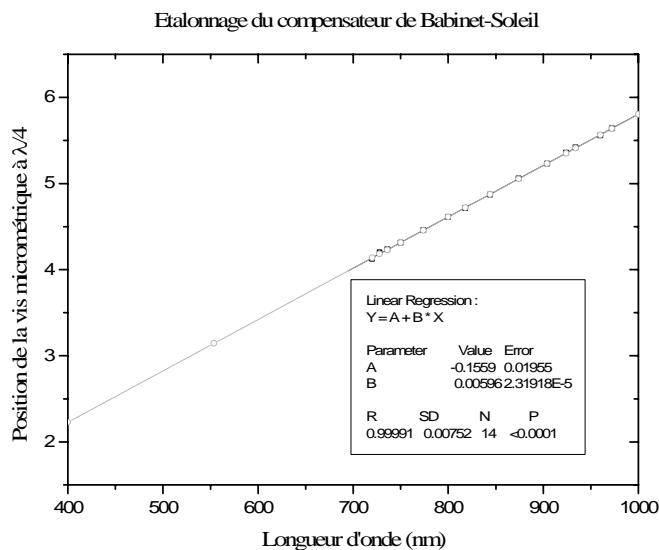
Chaque face du substrat réfléchit une partie du faisceau incident, un filtre spatial permet d'exclure le signal provenant de la face arrière. Le faisceau émergent ainsi sélectionné contient une partie de la lumière réfléchie et le signal de second harmonique. C'est le rôle des filtres précédant le détecteur de les séparer. On utilise pour cela, un filtre interférentiel à la longueur d'onde étudiée (transmettant entre 30 et 80% avec une largeur à mi-hauteur entre 10 et 12nm selon le filtre et la longueur d'onde utilisée). Le filtre interférentiel transmet également un très faible pourcentage du faisceau laser incident réfléchi par le substrat. Ce signal est d'amplitude nettement supérieure à celle de second harmonique. La lumière réfléchie par la première face du substrat masque donc le signal de second harmonique si on n'utilise pas un filtre passe-bas (type Schott BG39 d'épaisseur 2 ou 4mm).

Un prisme de Glan tournant motorisé sert à analyser la polarisation du signal de second harmonique.

Chaque élément optique est monté sur un support ajustable dans les trois directions de l'espace. Les lentilles sont positionnées par auto collimation. Il est important que les faisceaux traversent les composants, comme les prismes de Glan ou le compensateur de Babinet-Soleil, normalement à leur surface en leur centre, autrement l'analyse polarimétrique serait faussée.



**Figure II)B.1 :** courbe d'étalonnage du compensateur de Babinet-Soleil en position lame demi-onde. L'encadré correspond à un ajustement linéaire des valeurs expérimentales.



**Figure II)B.2 :** courbe d'étalonnage du compensateur de Babinet-Soleil en position lame quart d'onde. L'encadré correspond à un ajustement linéaire des valeurs expérimentales.

## ii. Détection

Nous avons utilisé avec ce montage deux types de détection liés à l'évolution technologique de l'électronique couplée aux photomultiplicateurs. La méthode 2 est moins coûteuse, et facile à mettre en œuvre, mais possède une sensibilité légèrement moindre que la première. Elles sont toutes deux particulièrement optimisées pour la mesure de flux très peu intense (moins d'un photon par impulsion incidente).

- Méthode 1 :

Un photomultiplicateur (Hamamatsu H5783P) de très faible bruit d'obscurité (20 photons par seconde) optimisé pour le comptage de photons délivre un courant converti en tension aux bornes d'un conducteur ohmique. Cette tension est une impulsion de 3ns d'amplitude variable correspondant au nombre d'électrons fourni par le photomultiplicateur. Ces électrons peuvent posséder plusieurs origines, ils peuvent correspondre à un photon incident, ou bien il peut s'agir de charges libérées thermiquement au niveau de la photocathode ou des premières dynodes. Les deux derniers cas correspondent au bruit thermoïonique intrinsèque du photomultiplicateur. Le bruit thermoïonique des dynodes fournira des impulsions d'amplitude moindre par rapport aux autres signaux. Un seuil de discrimination en tension peut être utilisé pour limiter ce bruit thermoïonique.

Ce photomultiplicateur a été choisi afin de pouvoir fonctionner en mode de comptage de photons avec discriminateur. En effet, la source utilisée initialement était un laser délivrant des impulsions picoseconde à un faible taux de répétition (centaine de Hz), régime dans lequel un comptage de photons durant une porte temporelle synchronisée avec le laser d'excitation est bien adapté (le temps durant lequel un photon peut être émis est faible devant celui d'obscurité).

Actuellement, la source laser délivre des impulsions de durée faible (100fs) par rapport à leur taux de répétition (82MHz soit un période de 12ns). Il n'est plus possible d'utiliser un comptage de photons à porte, le temps de réponse du détecteur (3ns) est, en effet, comparable au temps séparant deux impulsions excitatrices (12ns). Nous avons donc utilisé une détection synchrone à 160Hz. Ceci est tout à fait justifié car l'intensité incidente peut être considérée comme continue à l'échelle de 10ms. La détection

synchrone permet durant une demi période de la modulation de mesurer tout le bruit lié au montage expérimental et de le discerner du signal d'intérêt obtenu durant l'autre demi période.

L'amplificateur à détection synchrone délivre une tension continue qui est mesurée sur l'entrée analogique d'une carte d'acquisition. Une moyenne est effectuée sur un nombre variable de valeurs (entre 20 et 40), l'écart quadratique moyen fournit l'incertitude.

Nous avons estimé que le nombre typique de photons détectés qui est d'un photon tous les 30000 tirs laser. Cette valeur correspond à un régime de comptage de photons, même si la détection utilisée est différente.

- Méthode 2 :

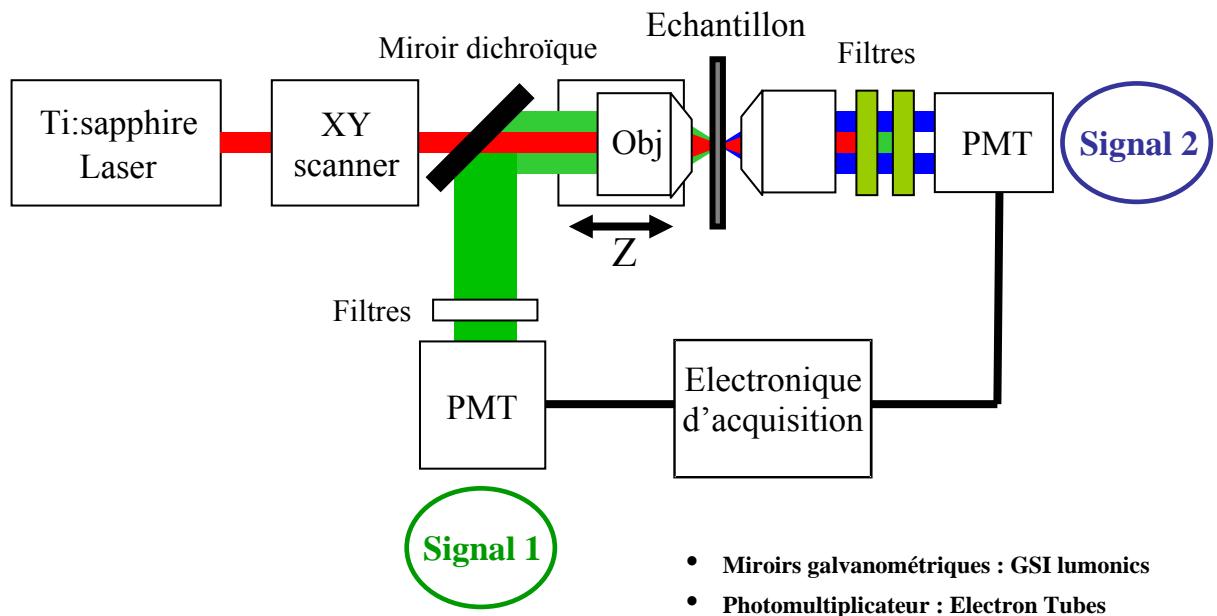
Nous avons également utilisé un module photomultiplicateur Electron Tubes (référence : P25PC, PM 911B, photocathode en bialkali, bruit d'obscurité : 50photons/s) pour détecter le signal généré par un film de collagène. Ce module comporte un discriminateur qui lui permet de générer une impulsion logique (TTL : +5V) pour chaque photon détecté au-delà du seuil de discrimination. Le temps de réponse du module lui permet de suivre des fréquences jusqu'à 100MHz supérieur à la fréquence de répétition des impulsions laser de 82MHz. Les impulsions logiques sont ensuite détectées par un compteur Electron Tubes (référence : CT2), le programme d'acquisition fournit au compteur une plage temporelle (100ms) durant laquelle il compte le nombre d'impulsions émises par le module photomultiplicateur. Une moyenne sur 20 ou 40 plages temporelles successives est effectuée et l'écart quadratique moyen fournit une incertitude sur la mesure.



## II) C. Microscope à balayage

### i. Principe de fonctionnement

Le principe de fonctionnement du microscope développé au Laboratoire d'Optique et Biosciences est exposé à la figure II)C.1. Son originalité tient au fait de pouvoir détecter simultanément les signaux transmis et rétroémis par l'échantillon. Nous nous attendons à trouver dans certains systèmes, comme les vésicules colorées, un signal de SHG surtout émis en transmission [Moreaux, 2000]. Le signal de fluorescence est émis de façon isotrope, il peut donc être détecté vers l'arrière. L'avantage de cette géométrie est de permettre une observation simultanée des signaux de TPEF et de SHG. Nous reviendrons au chapitre IV sur les avantages que cela comporte. Ce microscope a été développé au laboratoire dans la continuité des travaux menés à l'ESPCI [Beaurepaire, 1999]. Ce nouveau microscope a notamment vu son système de détection amélioré.



**Figure II)C.1 :** schéma de fonctionnement du microscope à balayage.

- Dispositif optique :

Il est possible d'atténuer la puissance incidente, pour cela le faisceau traverse une lame retard demi onde associée à un polariseur (prisme Glan-Laser). La rotation de la lame est assurée par un moteur pas à pas commandé via une interface par le programme d'acquisition.

- Miroirs galvanométriques : GSI lumonics
- Photomultiplicateur : Electron Tubes
- Ti:Sapphir laser: Tsunami, Spectra-Physics

Le faisceau incident se réfléchit sur les deux miroirs galvanométriques (GSI Lumonics). Ceux-ci sont ensuite imagés par deux lentilles convergentes sur la pupille arrière de l'objectif avec un agrandissement suffisant pour la couvrir complètement. Il traverse un miroir dichroïque (référence : 695 dcxru, Chroma Technology Corporation) pour entrer dans l'objectif (figure II)C.2). Ce dernier est monté sur une platine de translation verticale motorisée (figure II)C.3) permettant de focaliser le faisceau incident à différentes profondeurs dans l'échantillon.

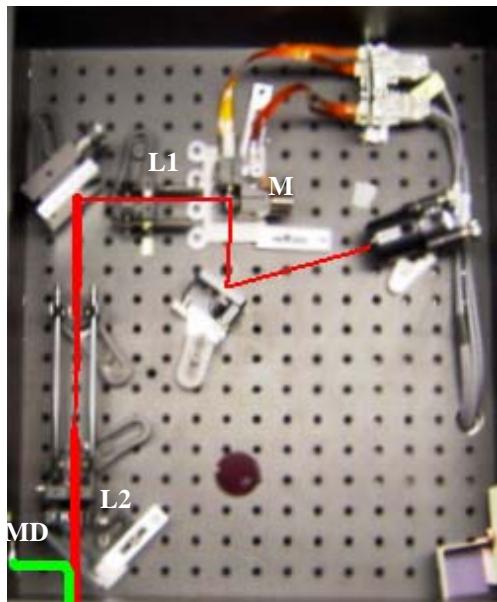
Le signal généré au point focal est collecté en transmission par un condenseur d'ouverture variable pouvant aller jusqu'à 1,4 (origine Olympus) (figure II)C.3). Il est ensuite renvoyé dans un plan horizontal grâce à un miroir à  $45^\circ$ , traverse différents filtres (E700SP, BG39 pour supprimer le faisceau incident transmis, et interférentiel ou large bande pour sélectionner le signal de second harmonique ou de fluorescence).

Le signal rétro émis est collecté par l'objectif, le signal de fluorescence est réfléchi par le miroir dichroïque pour se diriger vers une seconde ligne de mesure équipée des filtres adéquats.

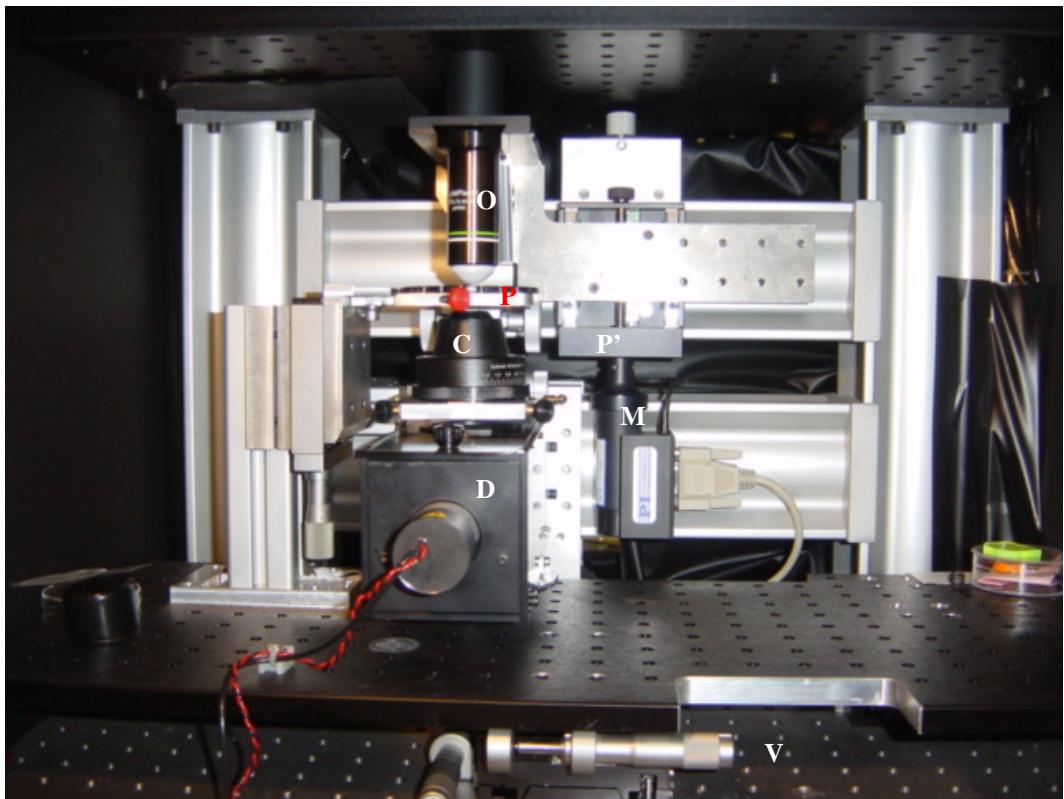
- Détection :

Le signal lumineux est converti en signal logique électrique par un module photomultiplicateur (Electron Tubes, référence : P25PC, PM 911B, photocathode en bialkali). Le temps de conversion (photon détecté-impulsion logique TTL) permet de travailler à une fréquence de 100MHz. Il est donc possible de détecter chaque photon émis par impulsion laser incidente. Un seuil de discrimination en tension est prétréglé pour filtrer une partie du bruit. Ce mode de détection est particulièrement adapté aux signaux de faible valeur correspondant à moins d'un photon à  $2\omega$  généré par impulsion incidente. L'électronique externe au module photomultiplicateur compte durant un temps de  $10\mu\text{s}$  (fréquence : 100kHz) le nombre d'impulsions logiques correspondant à un photon.

Il est possible de diminuer la vitesse de balayage des miroirs, et d'augmenter également le temps de comptage. Le temps d'exposition d'un pixel au flux incident est alors plus long. Pour une énergie incidente  $E$  ( $E=P\tau$ , où  $P$  est la puissance et  $\tau$  le temps d'exposition) il est alors possible d'ajuster séparément  $P$  et  $\tau$ . Il est également possible de moyenner l'intensité détectée sur plusieurs images (dans le cas où il s'agit d'un objet statique), afin de réduire le bruit de fond aléatoire. Il est possible de multiplier l'amplitude du signal par 16 ou 8 grâce à un gain électrique, (le bruit est alors également amplifié).



**Figure II)C.2 :** Trajet du faisceau dans le compartiment accueillant les miroirs galvanométriques (M) et les lentilles (L1,L2) montées de façon afocale pour élargir le faisceau. Le faisceau incident arrive normalement au plan de la figure. Le signal rétrocollecté se réfléchit sur le miroir dichroïque (MD) pour aller dans le compartiment de détection sur la gauche (non représenté).



**Figure II)C.3 :** ensemble de l'objectif (O), du condenseur (C), et de la ligne de détection (D) en transmission. Le porte-échantillon (P) est placé entre l'objectif et le condenseur. Un miroir placé dans le boîtier noir en dessous du condenseur permet d'orienter le faisceau transmis dans un plan perpendiculaire à celui de la figure. L'objectif peut se déplacer verticalement grâce au moteur (M) déplaçant une platine (P') présente au fond du montage. Des platines de translation peuvent être déplacées à l'aide de deux vis micrométriques accessibles sur le devant du montage (V).

## ii. Reconstruction des images

- Images TPEF et SHG :

Le microscope développé au laboratoire permet d'obtenir simultanément deux images. Une première image est obtenue en transmission, elle est souvent de SHG (déttection à travers un filtre interférentiel), car ce signal est émis surtout vers l'avant. Le signal de fluorescence permet d'obtenir une seconde image sur le second détecteur. Pour un point de l'échantillon  $M(x,y,z)$  on a donc deux intensités  $I_{SHG}(x,y,z)$  et  $I_{TPEF}(x,y,z)$ . Chaque image peut être représentée sur une échelle de gris, mais cela rend la superposition impossible. Nous avons choisi de représenter les images en fausse couleur. Sur une échelle d'intensité en vert (sauf cas particulier) nous représentons :  $I_{SHG}(x,y,z)$  et sur une échelle d'intensité en rouge :  $I_{TPEF}(x,y,z)$ . Il est ensuite possible de superposer les deux images, en ajustant au besoin la balance des couleurs entre le vert et le rouge pour conserver un maximum d'information sur la structure des tissus.

- Pile d'images :

Nous avons vu au chapitre I (partie A.iv) comment il était possible d'obtenir une image d'un objet dans le plan focal de l'objectif. En faisant varier la distance entre l'objectif et l'objet, il est possible d'obtenir son image en volume. Il faut ensuite trouver le moyen de représenter cette image en volume. La première manière consiste à présenter une séquence temporelle des différents plans obtenus à différentes profondeurs. Une seconde possibilité consiste à reconstruire l'image en volume et à présenter une animation de l'objet en le représentant successivement suivant différents angles de vue.

Une autre méthode consiste à visualiser une projection des images des différents plans dans un même plan parallèle. C'est la méthode choisie pour représenter nos résultats dans les chapitres III et IV. Nous avons utilisé deux modes de projections différents.  $I(x,y,z)$  est l'intensité émise au pixel de position  $x$ ,  $y$  et  $z$ ,  $z$  désigne la position par rapport à l'axe de l'objectif. Dans une première méthode on projette sur un plan (xy) l'intensité moyenne  $I_{plan}(x, y)$  pour un même pixel suivant les  $N$  différents plans.

$$I_{plan}(x, y) = \frac{1}{N} \sum_i^N I(x, y, z_i) \quad (\text{II.C-1}).$$

Dans la seconde méthode, on ne conserve que la valeur de l'intensité maximale suivant les différents plans :

$$I_{plan}(x, y) = \text{Max}_{z_i}(I(x, y, z_i)) \quad (\text{II.C-2}).$$

La première méthode est adaptée pour représenter des objets émettant une intensité assez uniforme. Dans le cas de discontinuités spatiales nombreuses, elles seront moyennées dans la somme en II.C-1, et n'apparaîtront plus. Cette représentation sera utilisée pour les sections d'artère carotide ou d'aorte. Celles-ci sont constituées de feuillets d'élastine concentriques le long de la direction z.

Pour un objet très lumineux noyé au milieu d'un tissu, il sera plus intéressant d'utiliser la seconde méthode. Cette technique sera également utile lorsque l'intensité émise varie rapidement par rapport aux coordonnées de l'espace, comme des feuillets percés de trous empilés les uns sur les autres.

### iii. Objectifs

Les objectifs utilisés se décomposent en deux groupes : les objectifs à immersion à eau et les objectifs à air.

Les premiers sont la plupart du temps utilisés dans un liquide physiologique comme une solution de Ringer ou de Tyrode (voir chapitre IV) dans lequel baigne les tissus frais.

Le tableau II.C.2 présente les différentes caractéristiques des objectifs utilisés. Les objectifs de fort grandissement transversal ont un champ de vue réduit. Ce sont évidemment ceux de plus fort grandissement, qui possèdent la plus forte ouverture numérique et donc la meilleure résolution (voir partie iii). Ceci est facilement compréhensible d'un point de vue purement géométrique. C'est aussi le moyen de prédire que la distance de travail de l'objectif est importante pour de faibles grandssements.

Un objectif dans le tableau a des caractéristiques particulières : il s'agit d'un objectif Olympus 20X à immersion à eau d'ouverture 0.95. Il possède à la fois une grande ouverture ce qui permet une résolution latérale de 400nm et un grandissement assez faible ce qui permet un champ de vue important d'1X1mm. Cela n'est rendu possible que par l'utilisation d'une lentille frontale de grand diamètre par rapport à celles utilisées habituellement sur les objectifs 20X. Les tailles des autres lentilles de cet objectif sont en conséquence et il en résulte un encombrement important. Le diamètre de la pupille arrière

est de 17mm alors que les microscopes commerciaux sont faits pour travailler avec des objectifs dont la pupille arrière ne dépasse pas la moitié de cette valeur.

Suivant l'utilisation envisagée, il conviendra d'utiliser un type d'objectif plutôt qu'un autre. Par exemple, pour aller voir en profondeur dans un tissu épais avec une résolution importante, il faudra utiliser un objectif à immersion possédant une grande distance de travail et une forte ouverture numérique. C'est le cas par exemple de l'objectif 20X à immersion, d'ouverture O.95 et de distance de travail (DT) de 2,2mm. Mais le champ de vue peut être insuffisant pour une étude de tissus dans leur ensemble, comme des sections d'artères carotides ou de la crosse aortique du rat. Nous préférerons alors un objectif 10X ou 4X d'ouverture et de résolution moindre qui peuvent être à air et qui possèdent également une grande distance de travail. Malgré l'avènement de nouveaux objectifs, un compromis doit toujours être effectué entre la résolution et le champ de vue.

Pour l'imagerie cellulaire (en solution), un objectif 60X (champ de vue 330 $\mu\text{m}$ ) est particulièrement adapté à l'observation d'objets d'une cinquantaine de microns. Il faut rechercher, pour ce type d'application, l'objectif qui possède la meilleure ouverture numérique, la distance de travail n'étant alors plus un critère de choix décisif.

<b>Objectifs</b>	grand.	Origine	O.N.	DT	Echelle (à 5%)	champ de vue	Résolution (800nm)	
					mm		$\mu\text{m}$	latéral (nm)
					$\mu\text{m}/\text{pixel}$		$\mu\text{m}$	axial (nm)
Fluar <b>100x</b> /1,3 oil	100	Zeiss	1,3	0,17	0,57	183	240	670
Plan Fluar 100x /1,45 oil	100	Zeiss	1,45	0,11			220	460
Plan Apochromat 100x /1,4 oil	100	Zeiss	1,4	0,09			225	530
Plan Fluorite FL/IR <b>60x</b> /0,90 W	60	Olympus	0,9	2	1,02	327	340	1430
Plan Neofluar 40x 0,75	40	Zeiss	0,75	0,5			400	1500
Prototype <b>20x</b> water	20	Olympus	0,95	2,2	3,1	978	320	1 250
LMPL <b>20x</b> IR air	20	Olympus	0,4	8,1	3,1	978	750	6000
Plan Neofluar <b>10x</b> 0,3 air	10	Zeiss	0,3	5,6	5,7	1 832	1000	11000
Uplan FI <b>4x</b> air	4				18	5 760		

**Tableau II)C.1 :** différents objectifs utilisés. grand. :grandissement transversal, NA : Numerical Aperture (Ouverture numérique), DT : Distance de Travail (à laquelle il faut placer l'objet), Echelle : étalonnage par rapport au scanner utilisé (grandissement numérique de 1 dans l'application).

## iv. Résolution

La résolution est la distance minimale qui permet de distinguer deux objets lumineux.

La résolution des microscopes à balayage possède deux sources de dégradation. Une tient seulement à l'objectif utilisé, l'autre au déplacement des miroirs.

La linéarité du déplacement des miroirs n'influence pas la résolution spatiale du microscope. Dans nos expériences, le facteur limitant est la résolution de l'objectif. Nous ne sommes jamais limités par l'incertitude sur la position des miroirs. La résolution est liée uniquement, dans notre instrument, au volume fini excité par la lumière incidente. La résolution latérale est calculée à partir de la largeur totale à mi-hauteur de la fonction au carré de répartition de l'illumination d'un point (IPSF : *Illumination Point Spread Function*) [Sheppard, 1990]. La résolution latérale  $d_{lat}$  d'un objectif, où la lumière incidente couvre parfaitement la pupille arrière est donnée par [Richards, 1959] :

$$\left\{ \begin{array}{l} d_{lat} = \frac{0,320.2.\lambda_{incidente}}{\sqrt{2}O.N.} \sqrt{\ln 2} \quad O.N.<0.7 \\ d_{lat} = \frac{0,325.2.\lambda_{incidente}}{\sqrt{2}(O.N.)^{0,91}} \sqrt{\ln 2} \quad O.N>0.7 \end{array} \right. \quad (\text{II.C-3})$$

$$\left\{ \begin{array}{l} d_{lat} = \frac{0,320.2.\lambda_{incidente}}{\sqrt{2}O.N.} \sqrt{\ln 2} \quad O.N.<0.7 \\ d_{lat} = \frac{0,325.2.\lambda_{incidente}}{\sqrt{2}(O.N.)^{0,91}} \sqrt{\ln 2} \quad O.N>0.7 \end{array} \right. \quad (\text{II.C-4})$$

la longueur d'onde  $\lambda$  utilisée pour le calcul est celle du rayonnement incident (le tableau II)C.1 présente les résultats pour 800nm). La résolution latérale est inversement proportionnelle à l'ouverture numérique (ou à sa puissance 0,91 dans le cas d'une grande ouverture numérique). Habituellement, les objectifs de plus fort grossissement sont donc ceux qui auront la plus grande ouverture et donc la meilleure résolution.

De la même manière, la résolution axiale de l'objectif est calculée à partir de la distribution axiale de l'intensité autour du foyer de l'objectif. On obtient  $d_{ax}$  à partir de la largeur totale à mi hauteur de l'IPSF<sup>2</sup> suivant l'axe de l'objectif [Richards, 1959] :

$$d_{ax} = \frac{0,532.2.\lambda_{incidente}}{\sqrt{2}[n - \sqrt{n^2 - (O.N.)^2}]} \sqrt{\ln 2} \quad (\text{II.C-5}).$$

La résolution axiale dépend de l'indice du milieu (pour l'eau n=1,33, pour l'huile n=1,5).

L'ensemble de ces résultats permet de calculer le volume d'excitation V :

$$V = \frac{\pi^{3/2}}{8} (d_{lat})^2 r_{ax} \quad (\text{II.C-6}).$$

Les valeurs des résolutions décrites auparavant, sont les distances au-delà desquelles l'on peut distinguer deux objets lumineux. Il est possible de localiser un objet lumineux individuel avec une précision meilleure que la résolution de l'objectif. Pour cela, il faut veiller à travailler avec un pas de balayage inférieur à la résolution optique de l'objectif. Si l'image est suffisamment lumineuse pour obtenir un rapport signal sur bruit important, un ajustement du profil d'intensité possédant un seul maximum permet de le localiser précisément [Thompson, 2002]. Le profil d'intensité alors mesuré est celui de la convolution du profil d'intensité incidente (gaussien de largeur à mi hauteur donnée par la résolution axiale de l'objectif) par la distribution spatiale de chromophores de l'objet isolé. Cette méthode de détection de pic sera mise à profit pour mesurer des variations de distance de l'ordre de 20nm dans le cas de déformations de cellules de cœur de grenouille (chapitre IV partie D).

Par exemple, pour une distribution  $\rho$  de chromophores uniaxiale suivant ( $Ox$ ) centrée en  $O$ , le signal  $S(x)$  de TPEF généré pour un point de focalisation à la distance  $x$  de la distribution de chromophores sera :

$$S(x) = K \int_{-\infty}^{+\infty} \rho(x'-x) I^2(x') dx' \quad (\text{II.C-7}).$$

I correspond au profil d'intensité gaussien incident, dont la largeur de  $I^2$  totale en 1/e est déterminée à partir du tableau II)C.1.

Si  $\rho$  possède un maximum très piqué (comme dans le cas de l'utilisation de billes fluorescentes de taille bien inférieure à l'IPSF), le cas extrême mathématique serait celui d'une distribution de Dirac, alors l'expression II.C-7 peut s'écrire :

$$S(x) \approx K' I^2(x) \quad (\text{II.C-8}).$$

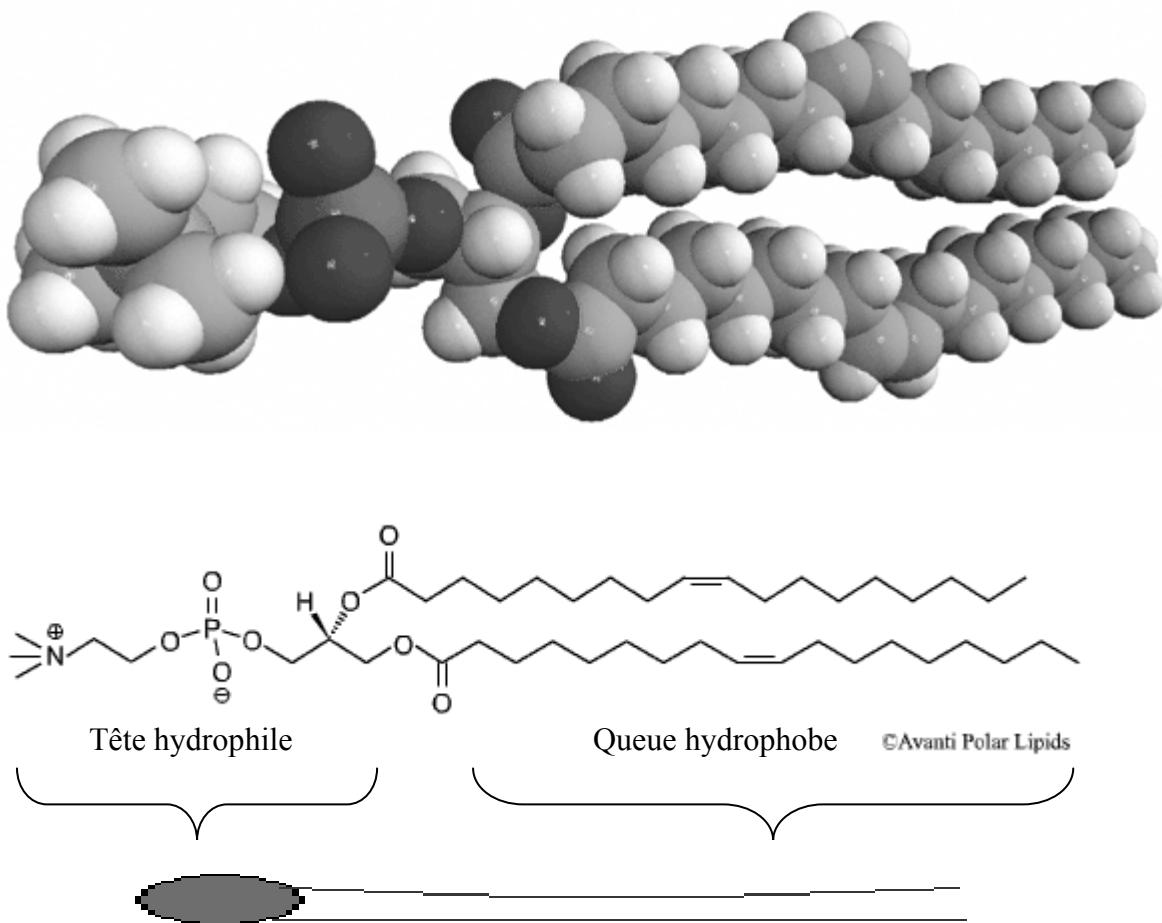
L'intensité émise aura donc le profil spatial de l'intensité incidente au carré centrée en  $O$ , c'est-à-dire au maximum de  $\rho$ . Comme l'image résulte du produit de convolution de deux

fonctions où chacune possède un seul maximum et où la largeur de l'une est bien supérieure à celle de l'autre, il suffira d'utiliser un ajustement gaussien pour repérer la position du maximum d'émission de l'objet (gaussien, comme le profil d'intensité de la distribution spatiale la plus large).

## II) D. Formation de vésicules unilamellaires géantes

### i. Membranes phospholipidiques

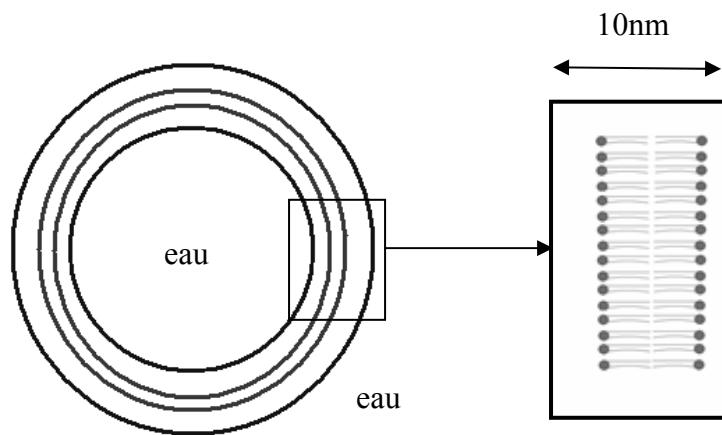
Afin de pouvoir tester l'insertion des colorants étudiés dans les membranes biologiques, nous avons synthétisé des membranes artificielles. Ces membranes ne sont constituées que d'un seul type de lipide, le plus fréquemment le DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine), à la différence des membranes naturelles où plusieurs lipides sont présents en proportions variables selon la nature de la membrane. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, elles possèdent une partie (tête) hydrophile et une autre (queue) hydrophobe. La tête possède un moment dipolaire élevé ce qui explique son affinité pour les solvants polaires comme l'eau, la queue composée de longues chaînes carbonées (apolaires) n'est pas soluble en milieu aqueux. Le DOPC représenté à la figure II)D.1 présente une telle structure.



**Figure II)D.1 :** modèle moléculaire d'une molécule de phospholipide (DOPC), sur la formule semi développée apparaît la partie hydrophile (disque) et hydrophobe (trait).

Cette espèce chimique n'est donc pas soluble en milieu aqueux. L'ensemble des molécules tendrait à se placer à l'interface air eau, mais une autre organisation en vésicule (figure II)D.2)

est possible, moins coûteuse en énergie. Une organisation en bicouche est nécessaire pour respecter les affinités hydrophile/hydrophobe lorsque les milieux intérieurs et extérieurs sont constitués essentiellement d'eau. D'autres arrangements en multicouche (toujours en nombre pair) sont également possibles. Il est assez facile d'obtenir des vésicules unilamellaire (contenant une seule bicouche lipidique) avec une taille de l'ordre d'une dizaine de nanomètre (par sonication d'une solution aqueuse de lipides), mais ces objets ne permettent pas une étude des interactions colorants-membranes à l'aide d'un microscope optique dont la résolution est micrométrique. Il faut donc pouvoir synthétiser des objets d'une dizaine de microns, ceci est assez aisé. Cependant, les vésicules alors formées sont multilamellaires avec les procédés usuels. La méthode d'électroformation présentée ensuite permet la fabrication de vésicules unilamellaires géantes (GUV).



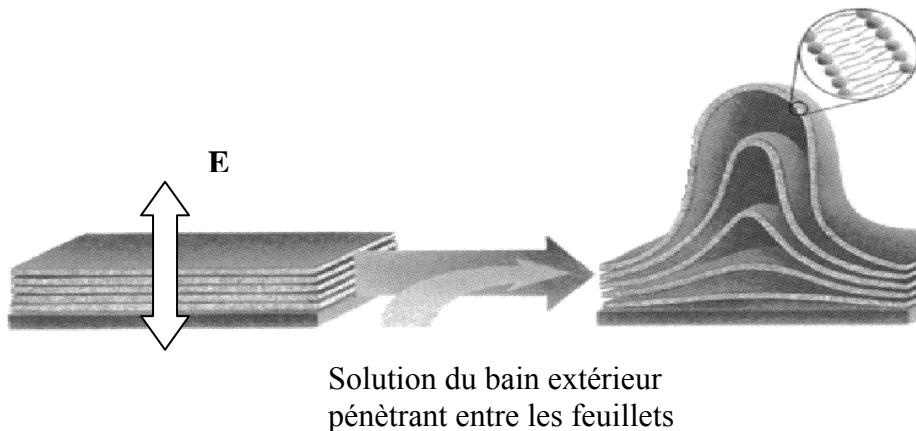
**Figure II)D.2 :** schéma d'une vésicule, dont la membrane est une bicouche lipidique de 10nm d'épaisseur.

Il est également possible de former des vésicules unilamellaires géantes naturelles (également appelées en anglais *blebs* : ampoules) à partir d'une fibre musculaire. Il faut pour cela extraire une fibre d'un faisceau constituant le muscle couturier de la patte de grenouille. Celle-ci doit être bien rectiligne, translucide, homogène et souple. Chacune de ses extrémités doivent être nouées par du fil de soie afin d'empêcher une entrée du milieu extérieur dans la fibre. Elle mesure entre 5mm et 10mm, on étire ensuite la fibre et on la laisse se contracter libérée de toute contrainte. Les vésicules se forment à la surface de la fibre au fur et à mesure de la contraction. Elles adoptent une géométrie quasi sphérique, elles ont l'avantage d'être remplies du même milieu intérieur que celui des fibres, leur membrane est naturelle, mais elles sont peu robustes et ne peuvent pas être stockées. Ceci limite leur utilisation comme membranes modèles pour l'étude des interactions colorants membranes.

## ii. Electroformation

- Principe :

Cette technique a été introduite par Angelova [Angelova, 1986], [Angelova, 1992]. Le principe est de permettre le décollement progressif d'une bicouche à partir d'un dépôt surfacique de lipide. Un champ électrique lentement variable (entre 5 et 20Hz) est appliqué perpendiculairement au film de phospholipides.



**Figure II)D.1 :** principe de formation des GUVs, décollement des bicouches par application d'un champ électrique oscillant (**E**).

La dernière couche est peu à peu décollée à cause des flux osmotiques électro induits à travers elle (figure II)D.1) Apparaissent à sa surface des cloques. La vésicule est formée une fois que la cloque s'est refermée sur elle-même.

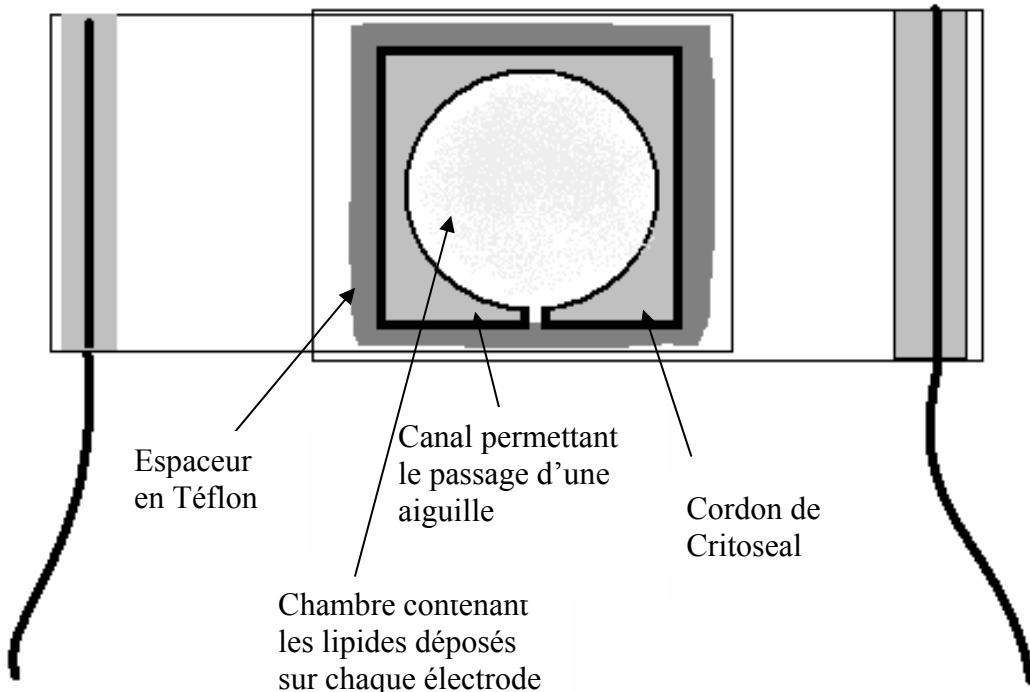
- Mode opératoire

Ce mode opératoire est très largement inspiré par celui qu'Olivier Sandre a développé lors de son travail de thèse de doctorat [Sandre, 2001]. Le champ électrique transverse est créé à l'intérieur d'un condensateur plan, où chaque électrode est constituée de verre sur lequel il y a un dépôt d'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO pour « Indium Tin Oxide »). Ce matériau transparent permet une observation de la préparation durant la synthèse à l'aide d'un microscope. Chaque plaque rectangulaire (80X50mm) se voit fixer un câble multibrins conducteur dénudé à une de ses extrémités sur la face conductrice dans le sens de la largeur

(figure II) D.2.2.). Le conducteur est plaqué sur l'électrode, on le fixe grâce à de la laque d'argent qui assure un bon contact entre la plaque et le câble en pénétrant entre les brins par capillarité. Il faut veiller à ne déposer pas de laque en dehors de la zone de recouvrement entre le câble et à l'électrode. Le montage est immobilisé jusqu'à séchage de la laque argentée durant plusieurs heures, puis toute partie contenant de la laque est recouverte de colle époxy, qui consolidera le montage. Un jour de séchage est alors requis.

- Sur une zone limitée circulaire de l'électrode, le lipide initialement solubilisé dans un mélange 2/3 chloroforme 1/3 méthanol est déposé. Ce mélange s'évapore plus lentement que le chloroforme seul et permet un étalement supérieur sur l'électrode.
- Les deux électrodes sont placées sous vide durant une à plusieurs heures afin d'évaporer toute trace de solvant.
- Un espaceur en téflon (45X45mm), d'épaisseur variable (entre 0.5 et 1mm), est placé sur une première électrode (voir figure II) D.2). Il possède un orifice circulaire correspondant à la zone de dépôt du lipide sur l'électrode, et un petit canal permettant le passage d'une aiguille.
- Un long et fin cordon de Critoseal (pâte inerte chimiquement) est disposé le long du périmètre rectangulaire de l'espaceur qui doit être en tout point plus épais que l'espaceur. On superpose alors la seconde électrode en comprimant le cordon pour assurer une étanchéité de la chambre contenant le lipide.
- Un champ électrique sinusoïdal est appliqué (tension entre électrodes de 0.5Veff entre 6 et 15Hz, la fréquence est de 6Hz pour l'eau pure et de 15Hz pour une solution trente fois plus visqueuse), on perce le cordon de Critoseal qui conduit au canal présent dans l'espaceur avec une aiguille.
- Une nouvelle aiguille est utilisée avec une seringue contenant la solution de gonflement. Le remplissage de la chambre se fait très lentement et doit être effectué en excès afin de supprimer les éventuelles bulles d'air présentes dans la chambre. De la Critoseal est étalée au niveau de l'orifice grâce à une spatule pour assurer l'étanchéité de l'ensemble.
- Toutes les 10minutes, la tension est augmentée de 0.2Veff pour atteindre 1.2Veff. Le montage reste ensuite une à six heures à cette tension (plus le mélange est visqueux et plus le temps est long). Pour finir, la tension est amenée à 1.3Veff à basse fréquence (4Hz) pour détacher des vésicules de la surface des électrodes. Il ne faut pas dépasser cette tension afin d'éviter l'électrolyse de l'eau ou la destruction des électrodes.
- La préparation est stockée au repos jusqu'à douze heures à 4°C.

- Un perçage du conduit est à nouveau réalisé avec une première aiguille, puis une seconde est utilisée pour les récupérer, celle-ci possédant un diamètre intérieur le plus grand possible pour permettre le passage des vésicules. Si le diamètre extérieur des aiguilles est trop gros, elle sépare les deux électrodes et la solution contenant les GUVs se répand. La solution contenant les GUVS peut alors être conservée plusieurs mois à 4°C.



**Figure II)D.2 :** vue de haut de cellule d'électroformation.

On utilise une solution de gonflement contenant  $100\text{mmol.L}^{-1}$  de sucre dans de l'eau distillée. Si les GUVs doivent être conservées longtemps, il est possible d'ajouter une trace d'azide de sodium ( $\text{Na}^+\text{N}_3^-$ ) à la concentration approximative d' $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  à la solution de gonflement avant la synthèse. L'azide est ajouté pour éviter toute prolifération bactérienne dans le milieu (le sucre étant un nutriment des bactéries).

Il est aussi possible d'inclure des ions dans la solution de gonflement. Il faut alors travailler avec un espaceur plus fin pour conserver la même limite de différence de potentiels en évitant l'électrolyse de l'eau (1,0V à pH=7) et en bénéficiant alors d'un champ électrique oscillant plus intense ( $E=\Delta V/d$ , où  $\Delta V$  est la différence de potentiel entre les deux électrodes espacées de  $d$ ). Notons, que l'on dépasse souvent cette valeur

aux maxima du signal (1,7V crête), mais pour des raisons cinétiques l'électrolyse de l'eau n'a pas lieu si la tension ne dépasse pas trop longtemps 1,0V.

Cette augmentation du champ est nécessaire pour essayer de réduire l'écrantage dû aux ions libres dans la solution. Nous avons pu synthétiser des vésicules unilamellaires d'un diamètre de 20 $\mu$ m contenant 5mmol.L<sup>-1</sup> de chlorure de potassium ( $K^+, Cl^-$ ) et 50mmol.L<sup>-1</sup> de sucre.

La solution contient toujours un peu de vésicules multilamellaires, mais la plupart sont unilamellaires. Leur taille peut aller jusqu'à 50 $\mu$ m de diamètre pour une solution de sucre de 50mmol.L<sup>-1</sup>. De façon générale, il faut diminuer la concentration de sucre pour obtenir des vésicules plus grosses, mais elles sont alors plus fragiles.

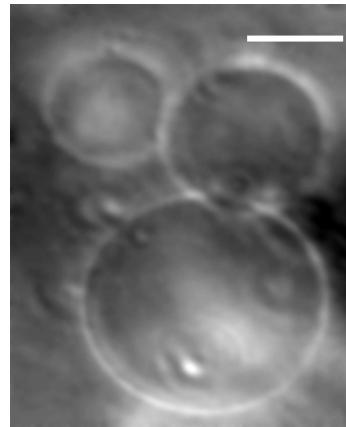
### iii. Observation

Afin de pouvoir observer les vésicules à l'aide d'un microscope traditionnel en lumière blanche, il faut rechercher un contraste entre le milieu intérieur et l'extérieur. L'épaisseur de la membrane d'environ 10nm est en effet bien trop faible pour être résolue.

Le milieu extérieur contiendra souvent du glucose à la même concentration que le sucre présent dans le milieu intérieur, cela pour équilibrer les valeurs des pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane. Ces deux solutions n'ont pas la même densité. Par exemple, une solution aqueuse de sucre à 100mmol.L<sup>-1</sup> a une densité de 1,040kg/L qui correspond à une solution aqueuse de concentration à 200mmol.L<sup>-1</sup> de glucose (le sucre contient 12 atomes de carbones, le glucose seulement 6). Cette différence est utilisée pour sédimentier les vésicules au fond d'un tube contenant une solution de glucose de même concentration que celle en sucre à l'intérieur des GUVs. Le temps de sédimentation est d'environ 10 minutes pour 200  $\mu$ L de solution de vésicules prélevée après synthèse dans 5 équivalents volumiques de glucose iso-osmolaire.

Cette variation de densité entre milieu intérieur et extérieur est mise à profit pour l'observation. Elle correspond à une différence d'indices optiques, avec un gradient très important localisé au niveau de la membrane du fait de sa taille très faible. La technique de contraste interférentiel différentiel (DIC), sensible justement au gradient d'indice optique, est adaptée pour imager les vésicules dans de telles conditions. La figure II) D.3 présente une image de vésicule observée en DIC par transmission grâce à un microscope inversé Axiovert 100TV de Zeiss avec un objectif Zeiss Plan Neofluar à air 40X d'ouverture numérique 0,75,

équipé d'un polariseur suivi d'un condenseur pour DIC, d'un biprisme de Nomarski et d'un analyseur. Les vésicules contiennent une solution de sucrose à  $50\text{mmol.L}^{-1}$  et à l'extérieur la solution de resuspension est de même concentration en glucose.



**Figure II)D.3 :** vue en DIC de GUVs contenant  $50\text{mmol.L}^{-1}$  de sucrose, la solution externe étant à  $50\text{mmol.L}^{-1}$  en glucose, la barre d'échelle en blanc mesure  $20\mu\text{m}$ .



## **Chapitre III**

### **Etude d'un colorant chiral : l'ASTB**

Il y a deux objectifs à ce travail. Le premier est de valider le modèle de Kuhn que nous avons étendu au domaine non linéaire, le second est de proposer un prototype de marqueur chiral membranaire.

Le modèle de Kuhn présenté dans la partie B du chapitre I, nous permet de prédire des valeurs de  $\Phi_{mp}$  et de LD non nulles pour une molécule dont la chiralité provient d'un couplage excitonique. Nous testons ces prédictions sur une telle molécule chirale : l'ASTB. Nous réalisons pour cela les trois expériences d'ORD-SHG de CD-SHG et de LD-SHG décrites au chapitre I. Nous testons également notre modèle en essayant de reproduire les résultats expérimentaux des expériences d'ORD-SHG à différentes longueurs d'ondes, plus ou moins proche de la résonance.

L'ASTB est également un prototype de marqueur membranaire chiral. Nous avons énoncé dans la partie D du chapitre I toutes les propriétés que doit posséder un marqueur. Nous avons choisi de travailler d'abord sur l'aspect qui nous semblait le plus original et le plus novateur : la chiralité par couplage excitonique du colorant. Le prototype que nous avons étudié a été synthétisé dans cette voie, il constitue une base pour ensuite développer de nouveaux colorants possédant toutes les qualités requises en microscopie non linéaire.

Dans la partie A nous présenterons l'ASTB, sa synthèse (au Laboratoire de Chimie de l'Ecole normale Supérieure de Lyon), et ses caractérisations spectroscopiques. Les résultats des expériences de génération de second harmonique par un film d'ASTB seront exposés dans la partie B. Dans la partie C, nous colorerons des membranes artificielles ou naturelles avec l'ASTB et nous les observerons en microscopie non linéaire. Enfin, une discussion des résultats obtenus sera faite dans la dernière partie, où des voies d'optimisation seront proposées.

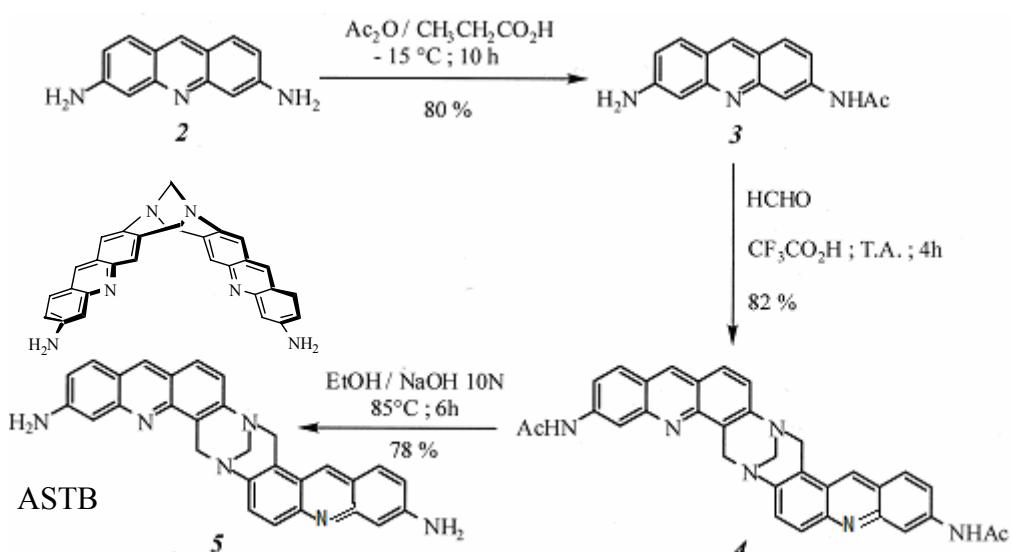
### III) A. Obtention et caractérisation de l'ASTB

Dans cette partie nous allons exposer tout d'abord la synthèse de l'ASTB (i), sa fixation sur un substrat de silice (ii), et enfin ses propriétés spectroscopiques. A partir des spectres d'absorption de l'ASTB et d'autres réactifs, nous pourrons en déduire la forme de l'ASTB suivant le milieu dans lequel elle se trouve (substrat ou solution aqueuse). Ceci fera l'objet de la partie iii. Enfin, pour compléter l'étude spectroscopique et optimiser son utilisation en microscopie non linéaire, nous mesurerons sa section efficace de fluorescence excitée à deux photons (iv).

#### i. Obtention de l'ASTB

- Synthèse :

L'ASTB (Acridine Substituted Tröger Base) a été synthétisé par M. Alexandre au Laboratoire de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon. Nous présentons sur la figure III.A.1 sa formule semi-développée (5), il s'agit d'une base de Tröger substituée par deux acridines. Le réactif de départ pour la synthèse est la proflavine (2), [Lhomme, 1999].

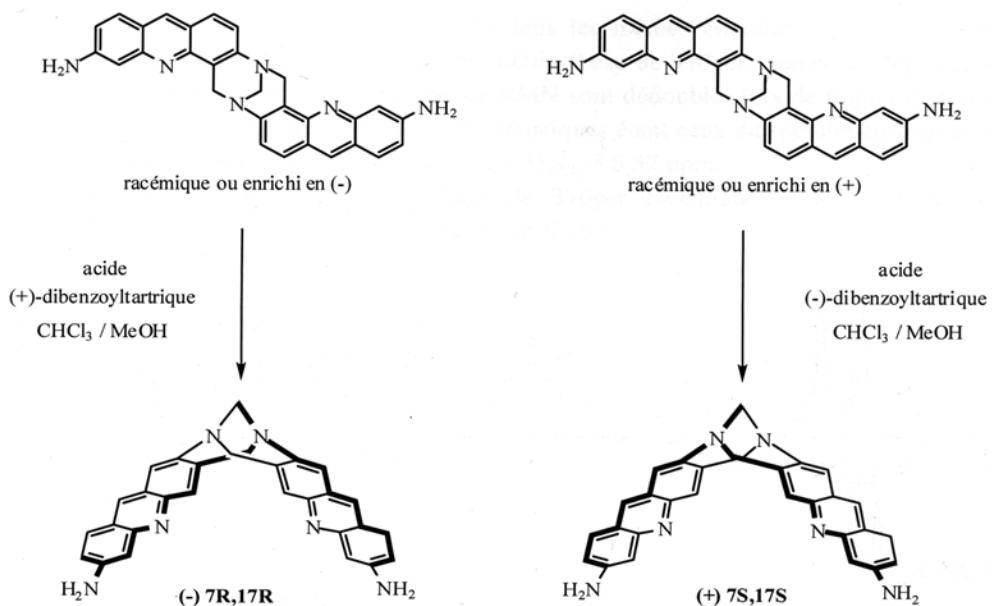


**Figure III)A.1 :** synthèse de la base de l'ASTB(5) à partir de la proflavine(2). La première étape protège de la polymérisation possible en milieu acide. La seconde étape permet de synthétiser la base de Tröger avec des groupements terminaux différents de ceux désirés, la dernière étape de déprotection des fonctions amines permet d'obtenir l'ASTB.

La solution obtenue est un mélange racémique contenant les deux énantiomères. Le rôle de l'étape suivante est de séparer physiquement ces deux molécules, on parle de dédoublement du mélange racémique.

- Dédoublement du mélange racémique :

Le principe du dédoublement est de faire réagir le mélange racémique obtenu avec un seul énantiomère d'une autre espèce chimique. Les deux diastéréoisomères, ainsi formés, ont alors des propriétés physiques différentes (par exemple les diastéréoisomères ont des températures de cristallisation différentes). Ils sont ensuite séparés en abaissant la température jusqu'à obtenir un seul diastéréoisomère solide, puis on reforme la molécule d'origine par réaction inverse et on obtient ainsi un seul énantiomère. On utilise l'acide (-)-dibenzoyltartrique (cf figure III)A.2) ou (+)-dibenzoyltartrique suivant l'excès énantiomérique présent initialement [Alexandre, 2002], [Tatibouët, 1999]. Un énantiomère est noté « - » (7R,17R), l'autre « + » (7S,17S).



**Figure III)A.2 :** dédoublement de l'ASTB par l'acide dibenzoyletartrique.

La solubilité de chaque énantiomère en milieu aqueux est très faible, sa mesure est assez peu précise en raison de sa faible valeur. Elle vaut approximativement  $10^{-6}\text{ mol/L}$ . Lorsque les réactions se font dans des milieux aqueux, sa très faible solubilité impose de travailler avec des volumes de solution importants, ce qui gène le travail de synthèse.

Les puretés énantiomériques sont vérifiées par RMN  $^1\text{H}$  en utilisant un agent de déplacement chiral. L'excès énantiomérique mesuré est de 61% pour le produit du dédoublement concernant l'énantiomère (+) et de 67% pour l'énantiomère (-).

Le pouvoir rotatoire spécifique mesuré à 546 nm vaut :  $2760 \cdot 10^{-1}\text{o}\text{cm}^2\text{g}^{-1}$  pour l'énantiomère (+) à  $25^\circ\text{C}$  et  $-3050 \cdot 10^{-1}\text{o}\text{cm}^2\text{g}^{-1}$  pour l'énantiomère (-).

## ii. Fabrication d'un film d'ASTB

Les expériences de SHG résolue en polarisation nécessitent le dépôt de l'ASTB en film mince. Pour cela, nous traitons le substrat de silice de façon à le rendre hydrophile (méthode décrite dans le premier point). Nous pensons ainsi réaliser des liaisons hydrogènes entre l'oxygène de la silice et les atomes d'hydrogène liés aux atomes d'azote de l'ASTB.

- Préparation du substrat :

Les substrats en silice sont préalablement nettoyés à l'éthanol, ils sont ensuite plongés dans un mélange savonneux à base de Dicron90 dans une cuve à ultra-son durant 10 minutes. Le mélange détergent restant sur les substrats est ensuite rincé à l'eau ultra-pure ( $18 \text{ M}\Omega\text{.cm}$ )

Nous avons travaillé avec des colorants hydrophiles. Les substrats de silice doivent être traités de façon à exalter leur hydrophilie pour que les colorants restent fixés sur leur surface. Nous utilisons pour cela un mélange acide sulfurique fumant et eau oxygénée dans les proportions (2/3, 1/3) en volume. Les lames restent au moins 30 minutes en présence du mélange. Ce mélange, aussi appelé piranha en raison de son très fort pouvoir oxydant (et acide), va rompre les liaisons covalentes entre les atomes de silicium et d'oxygène à la surface des substrats. Des groupements OH sont ensuite disponibles pour rendre la surface hydrophile, en permettant la présence de liaisons hydrogènes avec le colorant. Un plasma d'oxygène peut remplacer ce mélange pour rendre la surface hydrophile.

*La présence de l'acide ( $pH \sim 0$ ) permet d'augmenter le pouvoir oxydant de l'eau oxygénée.*

*Le couple d'oxydoréduction impliqué est  $H_2O_2/H_2O$  ( $E^\circ = 1,77V$ ):  $2e^- + 2H^+ + H_2O_2 = 2H_2O$*

*La valeur du potentiel standard s'écrit à 298K  $E \approx E^\circ + 0,06 \cdot \log(a_{H^+}) = E^\circ$  (loi de Nernst), avec une activité de 1 en milieu acide sulfurique.*

*La valeur de ce potentiel est importante et correspond à un pouvoir oxydant élevé. On observe également que ce potentiel est d'autant plus élevé que le pH est faible, d'où l'importance de se placer en milieu acide.*

Une fois traités, les substrats sont rincés à l'eau ultra pure (conductance  $> 18 \text{ M}\Omega\text{.cm}$ ).

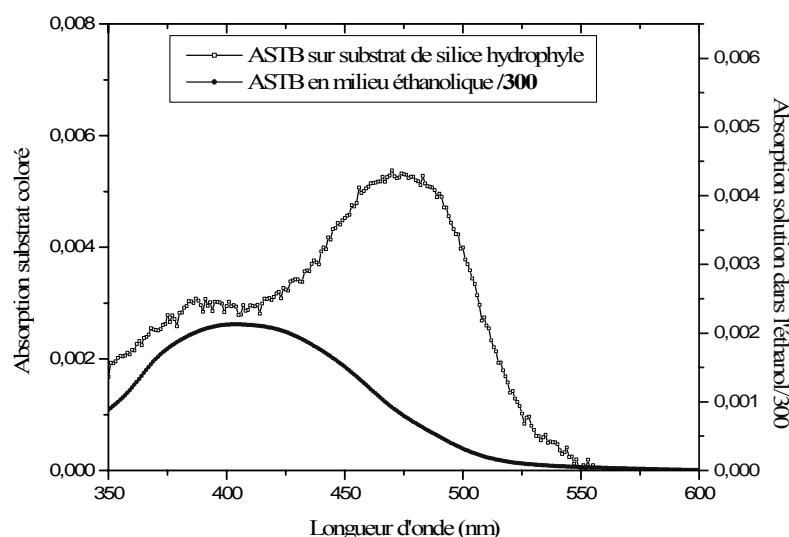
Nous observons une diminution progressive du caractère hydrophile des substrats et les utilisons moins de 24 heures après leur rinçage.

- Dépôt sur le substrat du colorant :

Le dépôt est réalisé par immersion : le substrat baigne dans une solution de colorant durant 20 minutes, l'échantillon est ensuite rincé avec de l'eau ultra pure et séché à l'aide d'un jet d'azote gazeux (inerte et sec).

Le film est caractérisé par spectrophotométrie. On trouvera à la figure III).A.3 le spectre d'absorption du substrat coloré par l'ASTB et celui du colorant dans l'éthanol. (Spectrophotomètre Varian Cary 500scan, et cuve QS 1mm, changement de lampe à 350 nm).

Il témoigne d'un dépôt d'ASTB sur la surface.



**Figure III).A.3 :** spectre d'absorption de l'ASTB déposé sur un substrat ou en solution dans l'éthanol (valeur divisée par 300 dans ce dernier cas).

La présence d'un pic d'absorption à 370 nm sur le substrat, également présent dans le spectre de l'ASTB dans l'éthanol, témoigne d'un dépôt de molécules d'ASTB sur le substrat.

Les différences entre les spectres seront interprétées dans la partie suivante, à la lumière d'autres données spectroscopiques.

L'absorption du film est faible, mais elle permet d'estimer la densité surfacique de molécules.

- Estimation de la densité surfacique déposée :

On peut estimer sa concentration connaissant celle de la solution dans l'éthanol.

Les densités optiques (DO) sont mesurées à 400 nm.

- Pour le film d'ASTB déposé sur un substrat, on mesure une DO=0,0032.
- Pour une solution d'ASTB dans l'éthanol placé dans une cuve nous mesurons : DO=0,7 pour une concentration de 0,32 mg/mL et un trajet d'1mm.
- La masse molaire de l'ASTB vaut : 454 g/mol, ceci nous permet d'en déduire l'absorption molaire  $\epsilon$  à 400 nm.  $\epsilon = \frac{0,7 \cdot 454}{0,32 \cdot 0,1} = 9930 \text{ mol}^{-1} \text{Lcm}^{-1}$ .
- La Densité optique du film est : DO= $\epsilon \cdot l \cdot [\text{ASTB}] = \epsilon \cdot \sigma$ ,  $\sigma$  étant la densité surfacique molaire d'ASTB.
- On trouve donc :  
$$\sigma = 0,0032 / 9930 = 3,3 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$$
- Le nombre de molécules par  $\text{cm}^2$   $N = N_A \cdot 3,3 \cdot 10^{-10} / 2 = 1,10^{14} \text{ molécules/cm}^2$  où l'on a divisé par deux pour un dépôt sur chaque face du substrat.

Le film peut être considéré comme une monocouche. Nous vérifions l'homogénéité et l'isotropie lors des mesures de l'intensité du signal de second harmonique en déplaçant l'échantillon et en le faisant tourner autour de la normale à la surface.

Une expérience d'interférométrie (Interféromètre de Fizeau illuminé par un laser He-Ne) nous permet également de vérifier l'absence de défauts majeurs dans l'homogénéité du dépôt surfacique.

### iii. Spectres d'absorption de l'ASTB

Afin de caractériser les propriétés de fluorescence de l'ASTB, nous avons mesuré les spectres d'absorption et de fluorescence excitée à deux photons de ce colorant. Comme nous le verrons dans la partie III)B, l'utilisation de l'ASTB comme colorant membranaire en microscopie nécessite l'ajout de glucose. Il sera donc utile d'étudier les propriétés spectroscopiques de l'ASTB dans une solution de glucose, et non dans l'eau pure où elle n'est que très peu soluble.

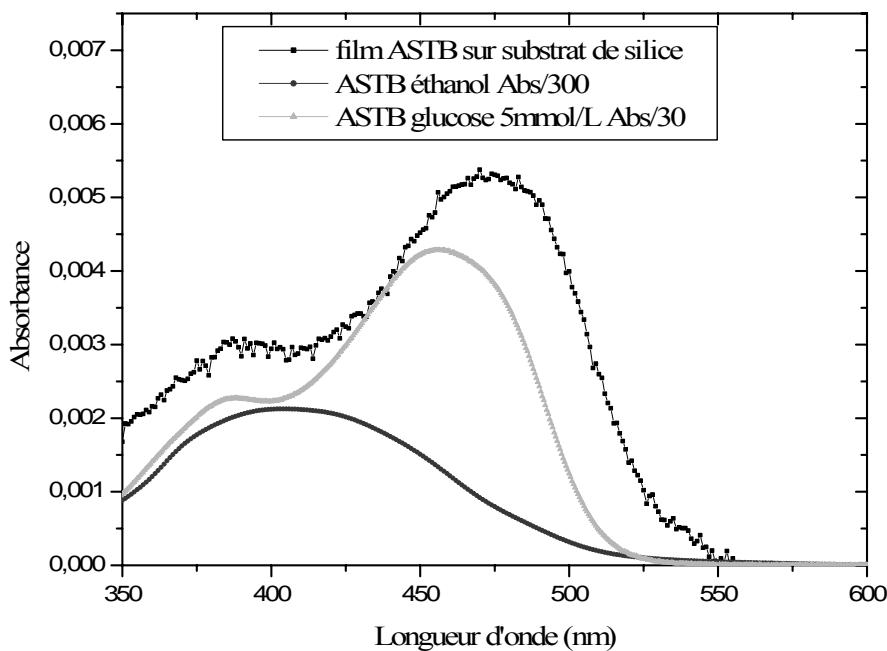
- Mesure des spectres d'absorption :

L'ensemble des mesures est réalisé sur un spectrophotomètre : Varian Cary 500scan dans une cuve QS (silice fondu) de 1 mm.

Nous avons mesuré le spectre d'absorption de l'ASTB dans une solution d'éthanol ( $7,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L) le spectre dans l'eau pure étant difficilement observable en raison de la très faible solubilité du colorant ( $10^{-6}$  mol/L). La référence (blanc) du spectre est alors mesurée par rapport à une solution d'éthanol pur.

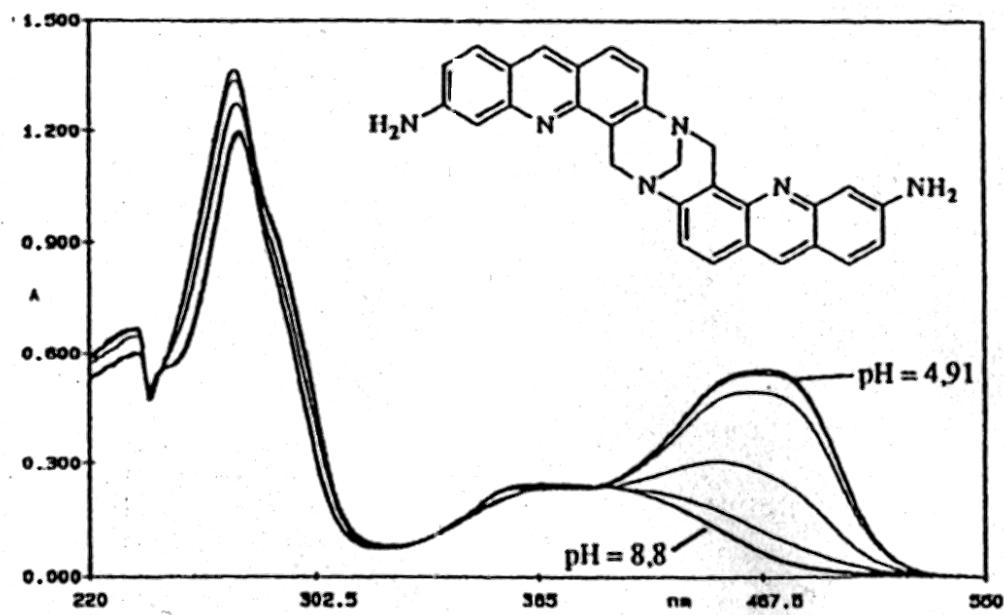
Nous avons également mesuré le spectre d'absorption du colorant dans une solution aqueuse de glucose à 5 mmol/L, la référence est mesurée avec une solution de glucose à 5 mmol/L. La solution est saturée en colorant (présence de cristaux d'ASTB avant filtrage). Un autre spectre d'absorption est mesuré sur un film d'ASTB déposé sur un substrat de silice rendu hydrophile. Ce dernier échantillon sera utilisé pour les mesures de second harmonique généré en surface. La référence est mesurée par rapport à un substrat nu hydrophile identique. Les substrats mesurent 6mm d'épaisseur.

L'ensemble de ces trois spectres est représenté sur la figure III)A.4. L'absorption dans l'éthanol est divisée par 300, et celle dans le glucose par 30, pour une représentation sur une échelle commune avec le spectre mesuré sur le substrat.



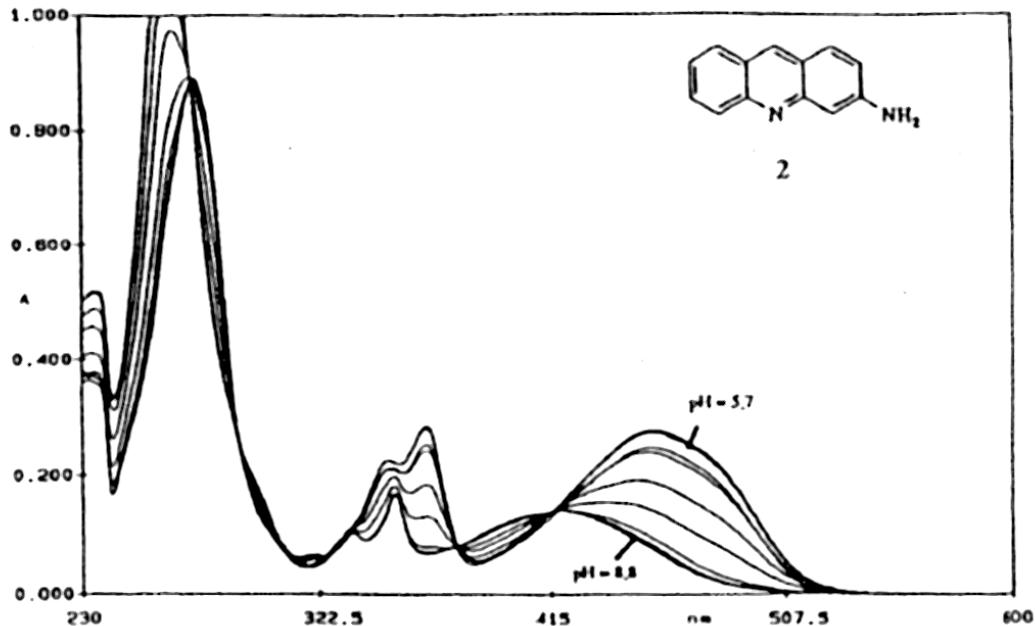
**Figure III)A.4 :** spectres d'absorption visibles à travers un film d'ASTB sur un substrat de silice hydrophile (noir), dans une solution d'éthanol (les valeurs sont divisées par 300) (cercles), dans une solution aqueuse de glucose à 5mmol/L (les valeurs sont divisées par 30) (triangles gris). Résolution 1nm.

Nous remarquons que les spectres ne présentent pas les mêmes pics d'absorption. Ces différences ne peuvent être interprétées qu'à la vue du spectre d'absorption de l'ASTB en fonction du pH. Ces spectres sont présentés sur la figure III)A.5. Ils sont réalisés dans une solution aqueuse à 30% de DMSO (diméthylsulfoxyde, solvant aprotique polaire) afin d'assurer la solubilité de l'ASTB. La solution contient également de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L, des ajouts de soude à 0,1 mol/L permettent d'ajuster le pH de cette solution.



**Figure III)A.5 :** spectre d'absorption UV-visible de l'ASTB en fonction du pH (dans une solution aqueuse de DMSO à 30%). [Tatiboët, 1996].

L'absorption de la 3-amino-acridine (un des deux substituants de la base de Tröger pour former l'ASTB) est présentée sur la figure III)A.6 en fonction du pH.



**Figure III)A.6 :** Spectre d'absorption UV-visible de la 3-amino-acridine en fonction du pH. [Tatiboët, 1996].

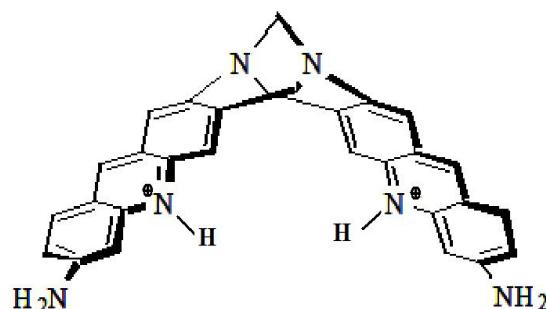
- Observations :

- Les deux solutions et le film présentent un pic d'absorption commun vers 370nm (figure III)A.4).
- Nous remarquons sur le spectre d'absorption du film et de l'ASTB dans le glucose qu'il y a un pic d'absorption présent à 470nm, absent dans la solution d'ASTB dans l'éthanol (figure III)A.4).
- L'ASTB est soluble dans la solution aqueuse de glucose, alors qu'elle l'est bien moins dans l'eau pure.
- Dans la solution aqueuse de DMSO, l'ASTB (figure III)A.5) absorbe uniquement vers 370nm en milieu basique (courbe pH=8,8), et à la fois vers 370nm et 467,5nm en milieu acide (courbe pH=4,91).
- Le spectre obtenu à pH=4,91 est identique à ceux obtenus en film ou en solution dans le glucose.
- Une détermination potentiométrique des pKa de l'ASTB fournit les valeurs pKa<sub>1</sub>=5,55 et pKa<sub>2</sub>=6,85 (dans le DMSO à 30%).
- Une comparaison avec les spectres d'absorption UV-visible de la 3-amino-acridine seule en fonction du pH (figure III)A.6) montre qu'il existe également un pic d'absorption à 470nm qui devient plus intense lors de la diminution du pH de la solution.
- La base de Tröger non substituée possède un pKa inférieur à 4,17 (dans l'eau).

- Interprétations :

- L'existence de deux valeurs de pKa implique l'existence de deux sites de protonation pour l'ASTB. L'ASTB est donc un diacide (les pKa étant inférieurs à 7).
- La comparaison avec la 3-amino-acridine conduit à supposer une protonation de l'azote de l'acridine pour expliquer les propriétés acido-basiques de l'ASTB (les autres atomes d'azotes de la base de Tröger ne pouvant être protonés à un pH de 5). La forme diacide de l'ASTB est représentée sur la figure III)A.7.

- Le premier pKa correspond à une double protonation (formation de l'entité N<sup>+</sup>-H) des azotes des acridines de l'ASTB, le second à une monoprotonation de l'un des deux atomes d'azote.
- Le pic d'absorption vers 470 nm est dû à une forme protonée de l'ASTB. L'absorption à 470 nm croît lorsque le pH diminue entre les deux pKa. Ceci s'explique par l'augmentation de la population de l'ASTB sous forme biprotonée. Cette forme présente uniquement une absorption plus intense que celle monoprotonée.



**Figure III)A.7 :** forme diacide de l'ASTB.

- L'ASTB déposée en film présente une absorption importante à 470nm, il s'agit donc d'une forme mono ou biprotonée de l'ASTB. C'est donc également le cas pour la solution de glucose.
- L'ASTB présente sur le film présente une absorption à 370nm importante qui est absente du spectre de la 3-amino-acridine. Il est dû à la base de Tröger, la molécule déposée en surface est donc bien de l'ASTB protonnée. Il n'y a pas eu rupture de la molécule sous forme de deux acridines.
- Comme l'ASTB se retrouve sous forme chargée dans le glucose du fait de sa protonation, sa solubilité en milieu aqueux est augmentée. Cette solubilité est donc en partie due à une forme chargée (1<sup>e</sup> ou 2<sup>e</sup>), mais une interaction avec le glucose autre qu'acido-basique ne peut pas être exclue (chélation, ou autres..).

- L'absence d'absorption marquée à 470nm pour la solution d'éthanol est alors aisée à comprendre. L'éthanol étant aprotique aux valeurs de pH étudiées, aucune protonation n'est alors envisageable.

- Conclusions :

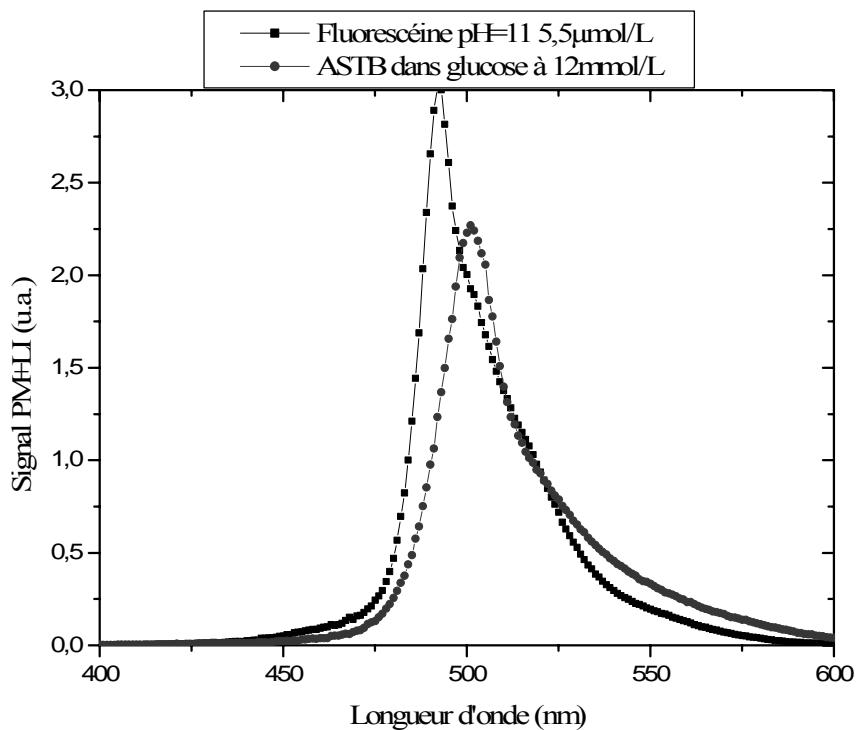
La solubilité de l'ASTB est grandement facilitée par la présence d'éthanol ou de glucose. Dans ce dernier cas, il existe une interaction entre l'ASTB sous forme chargée et le glucose qui implique une meilleure solubilité dans l'eau. Lors d'un dépôt en film sur un substrat de silice hydrophile, une forme protonée de l'ASTB est déposée. Les propriétés acido-basiques de la molécule proviennent des atomes d'azote des acridines.

#### iv. Spectre de fluorescence excitée à deux photons de l'ASTB

- Comparaison avec le spectre de TPEF de la fluorescéine :

Grâce au spectrofluorimètre décrit au chapitre II dans la partie A, nous avons mesuré le spectre d'émission de l'ASTB dans une solution de glucose à environ 15 mmol/L sous une excitation à 760 nm par un laser Ti : saphir de largeur spectrale à mi-hauteur 11nm correspondant à une durée d'impulsion de 100fs environ. De la même manière, on mesure le spectre d'émission d'une solution de fluorescéine à pH=11. Toutes les mesures ont lieu à 295 K. L'objet de ces expériences est de montrer que les spectres de fluorescence entre ces deux colorants se recouvrent, et donc, que la fluorescéine dont le  $\sigma_2$  est connu peut servir d'étalon pour déterminer le  $\sigma_2$  de l'ASTB.

Les spectres sont présentés sur la figure III)A.8, le pas du monochromateur est de 1nm les fentes mesurent 1mm. Des mesures d'absorption ont permis d'obtenir précisément les valeurs des concentrations des solutions utilisées. Pour la fluorescéine à pH=11 sa concentration est de 5,5  $\mu$ mol/L et pour l'ASTB sa concentration est de 12 mmol/L.



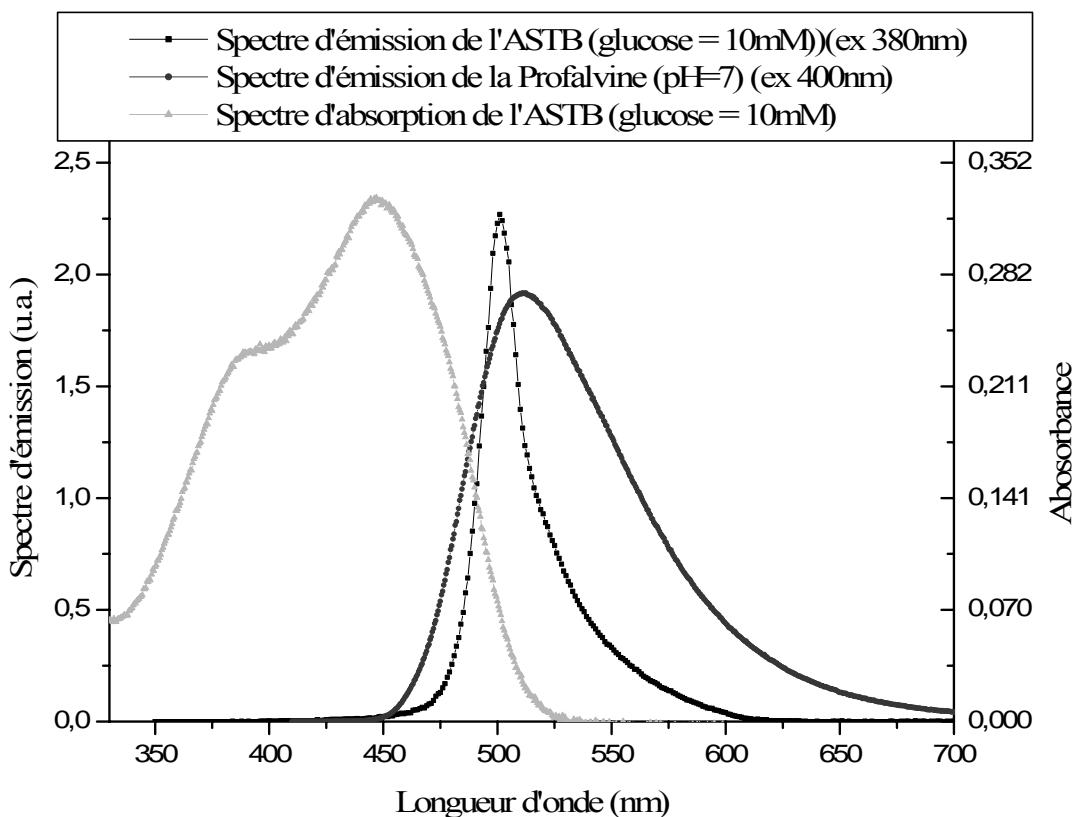
**Figure III)A.8 :** spectre d'émission de l'ASTB (cercles) à 12mmol/L dans du glucose et de la fluorescéine (carrés) à pH=11 à 5,5µmol/L sous une excitation à 760nm.

Les spectres de l'ASTB et de la fluorescéine se recouvrent presque complètement, le pic d'émission de l'ASTB est centré à 501nm celui de la fluorescéine à 492nm. L'utilisation de la fluorescéine au pH considéré est dès lors possible pour obtenir le  $\sigma_{\text{fluo}}^{(2)}$  de l'ASTB. Aucune correction spectrale n'est à envisager puisque tous les éléments du spectrofluorimètre ont une réponse spectrale identique entre 490nm et 500nm.

- Spectre de fluorescence de l'ASTB dans le glucose comparée à celui de la proflavine :

Nous comparons sur la figure III)A.9 les spectres d'émission de l'ASTB dans le glucose et celui de la proflavine (figure III)A.1, molécule 2) dans l'eau. Les spectres sont différents, celui de l'ASTB présente un maximum d'absorption à 500nm, celui de la proflavine (pH=7) se situe à 520nm, ce dernier étant également plus large [Du, 1998]. L'ASTB ne peut donc pas être considéré comme l'ensemble de deux proflavines juxtaposées sans interaction.

Leur propriétés physiques (solubilité dans l'eau) et spectroscopiques sont différentes (spectre d'émission).



**Figure III)A.9 :** Comparaison de spectre de fluorescence l'ASTB en solution dans le glucose (carrés) avec celui de la proflavine dans l'eau (cercles). Le spectre d'absorption de l'ASTB dans le glucose est rappelé en gris. (M : mol/L).

- Mesures de section efficace de fluorescence à deux photons de l'ASTB :

Nous avons utilisé toujours le même instrument sans le monochromateur pour réaliser les mesures de section efficace de l'ASTB. Les valeurs de section efficace de fluorescence excitée à deux photons pour la fluorescéine sont obtenues à partir des mesures de [Xu, 1996]. Nous utilisons une valeur du rendement quantique de fluorescence de 0,9 sur tout le spectre pour la fluorescéine. Nous travaillons avec des impulsions fournies par le même oscillateur Ti : Saphir (Tsunami de SpectraPhysics) taux de 86MHz avec des impulsions larges, en moyenne, de 100fs (11nm). La solution de fluorescéine est au même pH=11, sa concentration est de  $4,6\mu\text{mol/L}$ . L'ASTB est en solution dans le glucose à une concentration de  $10^{-4}\text{mol/L}$ . Nous n'avons pas détecté de signal de fluorescence dans les mêmes conditions d'excitation pour une solution de glucose identique sans colorant. Les signaux de fluorescence traversent un filtre E700sp et 2mm de BG39 avant de parvenir sur la photocathode du photomultiplicateur. Nous avons vérifié la linéarité du signal détecté avec le carré de la

puissance incidente, nous sommes ainsi certain de la non saturation de l'absorption aux longueurs d'onde utilisées et aux puissances considérées.

Nous réalisons une mesure tous les 20nm ce qui correspond à la largeur spectrale totale des impulsions incidentes de 100fs. Le spectre couvert est celui de l'oscillateur Ti : Saphir et va de 720nm à 960nm.

Les résultats sont présentés dans le tableau III)A.1. Le signal est ensuite divisé par la puissance incidente au carré et par la concentration. La puissance incidente n'est pas celle qui est présente au foyer de l'objectif mais celle présente à la sortie du Laser qui lui est proportionnelle.

Longueur d'onde (nm)	Puissance incidente (mW) P	Signal (ASTB : 0,1mM) (u.a.)	Signal (fluorescéine : 4,6μM) (u.a.)	S(ASTB)/P <sup>2</sup> /C	S(Fluo)/P <sup>2</sup> /C
720	520	1,55	3,4	0,057	2,7
740	610	3,5	8,4	0,094	4,9
760	670	3,3	9,4	0,073	4,5
780	700	3,3	10,4	0,067	4,6
800	600	5,2	17,9	0,14	11
820	620	4,6	14,5	0,12	8,2
840	530	2,31	4,65	0,082	3,6
860	460	1,1	1,66	0,052	1,7
880	520	1,15	1,75	0,042	1,4
900	500	0,55	1,2	0,022	1,0
920	380	0,38	1,16	0,026	1,76
940	330	0,2	0,6	0,018	1,2
960	250	0,06	0,16	0,0096	0,56

**Tableau III)A.1 :** Signaux de fluorescence mesurés pour l'ASTB (0,1mmol/L) et de la fluorescéine (4,6μmol/L) à pH=11. Les signaux sont divisés par la puissance incidente au carré et par la concentration des solutions. (M : mol/L). C désigne la concentration et P la puissance incidente.

A partir des signaux S(Fluorescéine) et S(ASTB) ainsi que des valeurs de  $\sigma_2(\text{Fluorescéine})$  on obtient  $\sigma_2(\text{ASTB})$  grâce à la relation :

$$\frac{\sigma_2(\text{ASTB})}{\sigma_2(\text{Fluorescéine})} = \frac{S(\text{ASTB}) / P^2 / [\text{ASTB}]}{S(\text{Fluorescéine}) / P^2 / [\text{Fluorescéine}]}$$

P désigne la puissance incidente et les quantités entre crochets les concentrations.

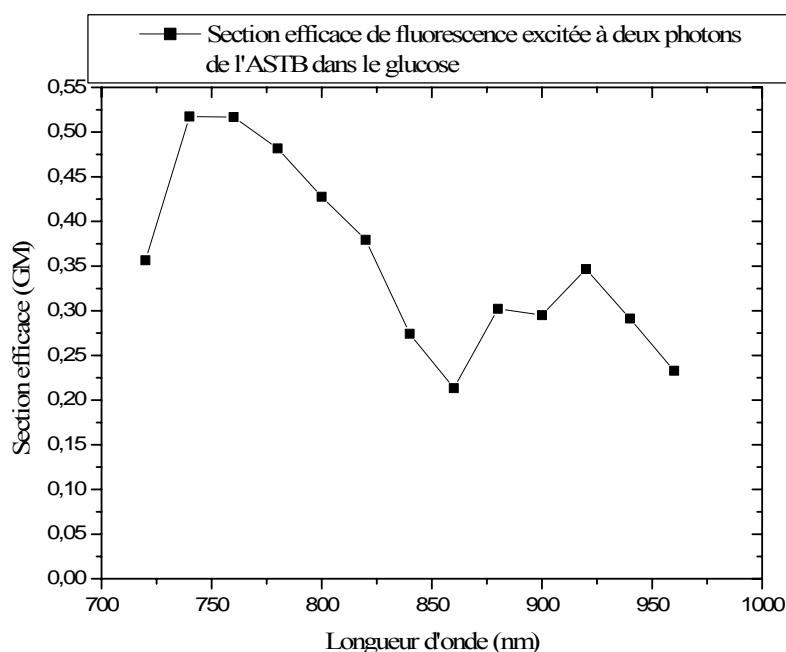
Les résultats sont présentés au tableau III)A.2.

L'incertitude sur les valeurs est importante. L'incertitude relative sur la mesure du signal de fluorescence est de 6% pour la fluorescéine et l'ASTB et les valeurs de [Xu, 1996] sont entachées d'une erreur relative minimale de 25%, ce qui nous conduit à une incertitude relative minimale de 37% sur la section efficace de l'ASTB.

Longueur d'onde (nm)	$\sigma_2(\text{Fluo})(\text{GM})$ (Xu, 1996) (25%)	$\sigma_2(\text{ASTB})(\text{GM})$ (37%)
720	17	0,36
740	27	0,52
760	32	0,52
780	33	0,48
800	32	0,43
820	26	0,38
840	12	0,27
860	7	0,21
880	10	0,31
900	14	0,30
920	23	0,35
940	19	0,29
960	13,5	0,23

**Tableau III)A.2 :** section efficace de fluorescence excitée à deux photons pour l'ASTB, obtenue à partir de celle de la fluorescéine à pH=11.

Nous représentons sur la figure III)A.10 la section efficace de fluorescence excitée à deux photons de l'ASTB en GM ( $1\text{GM}=10^{-50}\text{cm}^4\text{s}/\text{photon}$ ).



**Figure III)A.10 :** section efficace de fluorescence excitée à deux photons de l'ASTB dans le glucose en GM ( $1\text{GM}=10^{-50}\text{cm}^4\text{s}/\text{photon}$ ).

Conclusions :

- Nous remarquons sur le tableau III)A.2 que la section efficace de l'ASTB est entre 40 et 80 fois plus petite que celle de la fluorescéine. Cette différence n'est pas du tout rédhibitoire pour une utilisation en microscopie non linéaire (TPEF). En effet, nous verrons dans la partie suivante, que l'ASTB présente une remarquable photostabilité ainsi qu'une très grande affinité pour les membranes biologiques et une très faible toxicité.
- Son utilisation sera optimale vers 750nm ou 920nm (maxima de la figure III)A.9), la dernière valeur sera préférée en microscopie, en raison d'une diffusion moindre aux plus grandes longueurs d'onde.

Après avoir caractérisé les propriétés d'absorption et de fluorescence de l'ASTB, nous allons étudier ses propriétés de génération de second harmonique en surface. Cette étude constitue la point central de ce chapitre : nous allons nous intéresser aux effets chiroptiques et tester le modèle d'oscillateurs couplés introduit au chapitre I.



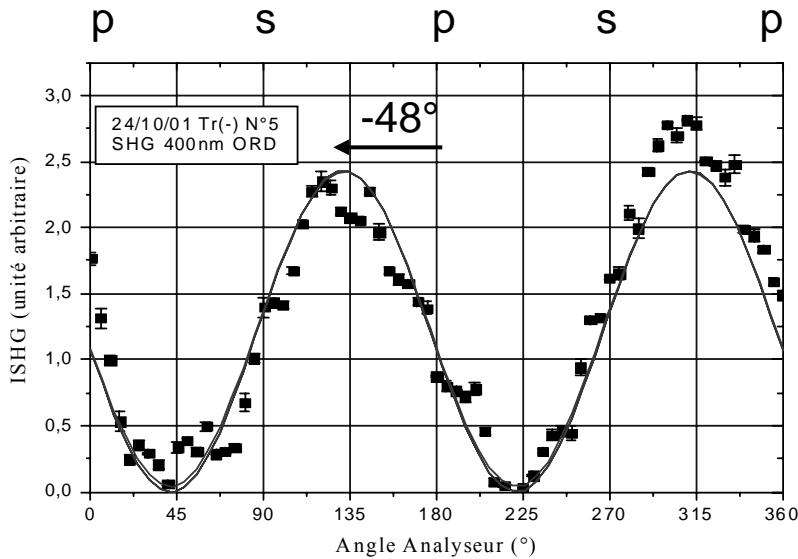
### III) B. Génération de second harmonique en surface par l'ASTB

L'ASTB est une molécule dont la chiralité provient d'un couplage excitonique. Le modèle de Kuhn étendu au effets non linéaires permet de prédire une activité optique dans les expériences d'ORD et de LD (cf. chapitre I partie B). Nous allons donc réaliser ces expériences de génération de second harmonique en surface sur un film d'ASTB pour valider nos modélisations. Nous présentons tout d'abord les résultats des expériences d'ORD, de CD<sub>p,s</sub> et de LD<sub>p,s</sub>. Ensuite, nous comparons l'activité optique de second harmonique obtenue aux prédictions théoriques développées au chapitre I. La comparaison avec le modèle des oscillateurs couplés est enfin abordée de façon quantitative en ce qui concerne les spectres de rotation.

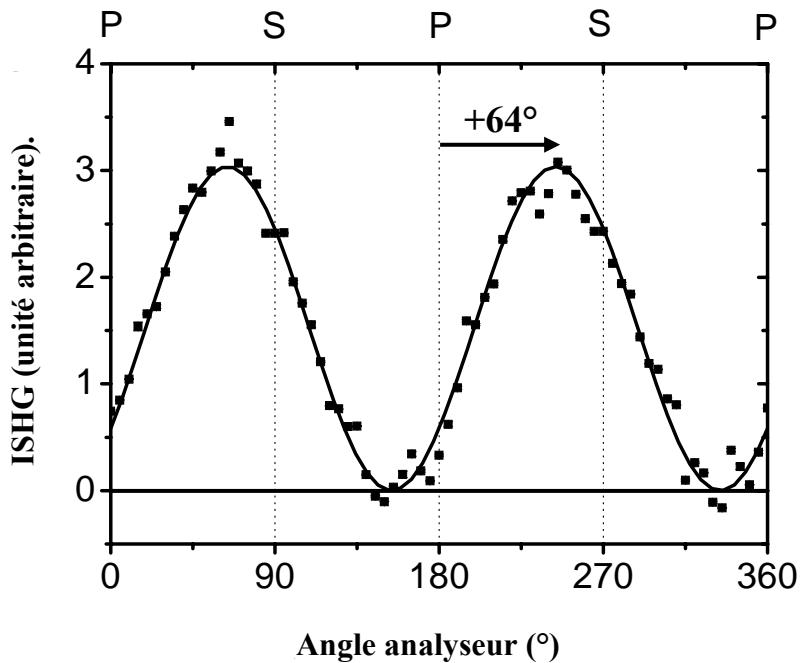
#### i. Expériences d'ORD

Nous avons réalisé plusieurs expériences d'ORD-SHG, à différentes longueurs d'onde sur chaque énantiomère de l'ASTB et sur le mélange racémique. Les expériences d'ORD-SHG sur un mélange racémique (50%ASTB(+), 50%ASTB(-)) n'ont témoigné d'aucune activité optique.

Nous avons utilisé l'énantiomère (-) et mesuré la rotation optique entre 700 et 1000 nm, et entre 750 et 1000 nm pour l'énantiomère (+). Sur la figure III)B.1, l'intensité du signal de SHG est représenté en fonction de l'angle de l'analyseur, pour une polarisation incidente p à 800 nm de puissance 800 mW et l'énantiomère (-). Sur la figure III)B.2, il s'agit de l'énantiomère (+), pour une polarisation incidente p à 720 nm et 320 mW.



**Figure III)B.1 :** ORD-SHG, intensité du signal de second harmonique pour l'énantiomère (-) de l'ASTB. Les points expérimentaux (en noir) sont ajustés par un cosinus carré où la rotation est de  $-48^\circ$ . L'excitation a lieu à 800nm sous 800mW (100fs à 86MHz). Les polarisations analysées (s ou p) apparaissent en haut de la figure.



**Figure III)B.2 :** ORD-SHG, intensité du signal de second harmonique pour l'énantiomère (+) de l'ASTB. Les points expérimentaux (en noir) sont ajustés par un cosinus carré où la rotation est de  $+64^\circ$ . L'excitation a lieu à 720nm, 380mW. Les polarisations analysées (s ou p) apparaissent en haut de la figure.

- Observations :

- Les courbes possèdent une périodicité de  $180^\circ$  (moitié d'une révolution de l'analyseur), ce qui est naturel, puisque les positions  $0^\circ$  et  $180^\circ$  sont équivalentes si l'alignement du montage est correct.

Cette périodicité est importante pour vérifier la non dégradation de l'échantillon au cours de la mesure. Une altération de celui-ci entraînerait une décroissance du signal avec l'angle de l'analyseur. Le temps d'exposition du film est celui requis pour effectuer la mesure. Entre l'angle d'origine et un angle de  $360^\circ$ , le film a été illuminé durant 20minutes.

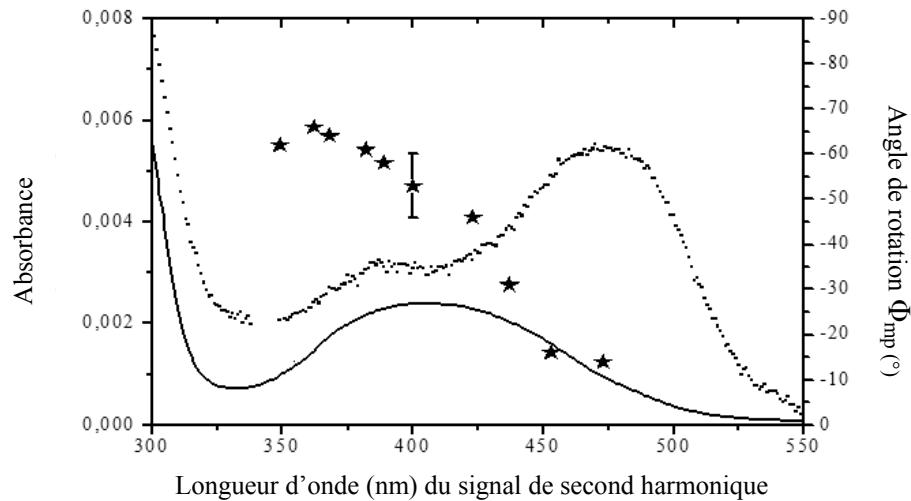
- Les courbes ne sont pas symétriques par rapport à la position  $180^\circ$  de l'analyseur. Cette dissymétrie est une indication de la présence de molécules chirales.

L'ajustement est obtenu à partir de la formule I.B-33, et fournit l'angle  $\Phi_{mp}$ , indiqués sur les figures précédentes. Les autres paramètres extraits seront exposés dans la dernière partie de ce chapitre.

- Nous observons une rotation ( $\Phi_{mp}$ ) de  $-48^\circ \pm 3^\circ$ , le signe de cette rotation est opposé pour l'autre énantiomère (+) (cf. figure III)B.2 où l'énantiomère (+) est utilisé à 720nm où l'on observe un  $\Phi_{mp}$  de  $64^\circ \pm 3^\circ$ ).
- Sur tout le spectre, les rotations pour chaque énantiomères possèdent la même amplitude, et sont de signe opposé.
- Nous remarquons une annulation totale du signal pour certains angles de l'analyseur.

Nous représentons sur la figure III)B.3 les angles de rotation pour les différentes longueurs d'ondes étudiées (pour le signal de second harmonique), pour l'énantiomère (-) de l'ASTB. Nous avons représenté sur le même graphique les spectres d'absorption du film déposé sur un substrat et d'une solution d'ASTB dans l'éthanol ( $7.10^{-4}$ mol/L). Les valeurs de rotations vont de  $-14^\circ$  à 500nm à  $-68^\circ$  au maximum à 360nm (pour  $10^{13}$ molécules/cm $^2$ !). Les angles sont connus avec une précision de l'ordre de 12%. Nous effectuons plusieurs mesures sur différents échantillons, la dispersion des valeurs de  $\Phi_{mp}$  autour de la moyenne, nous fournit l'incertitude de la mesure. L'incertitude relative est plus importante pour les faibles valeurs de

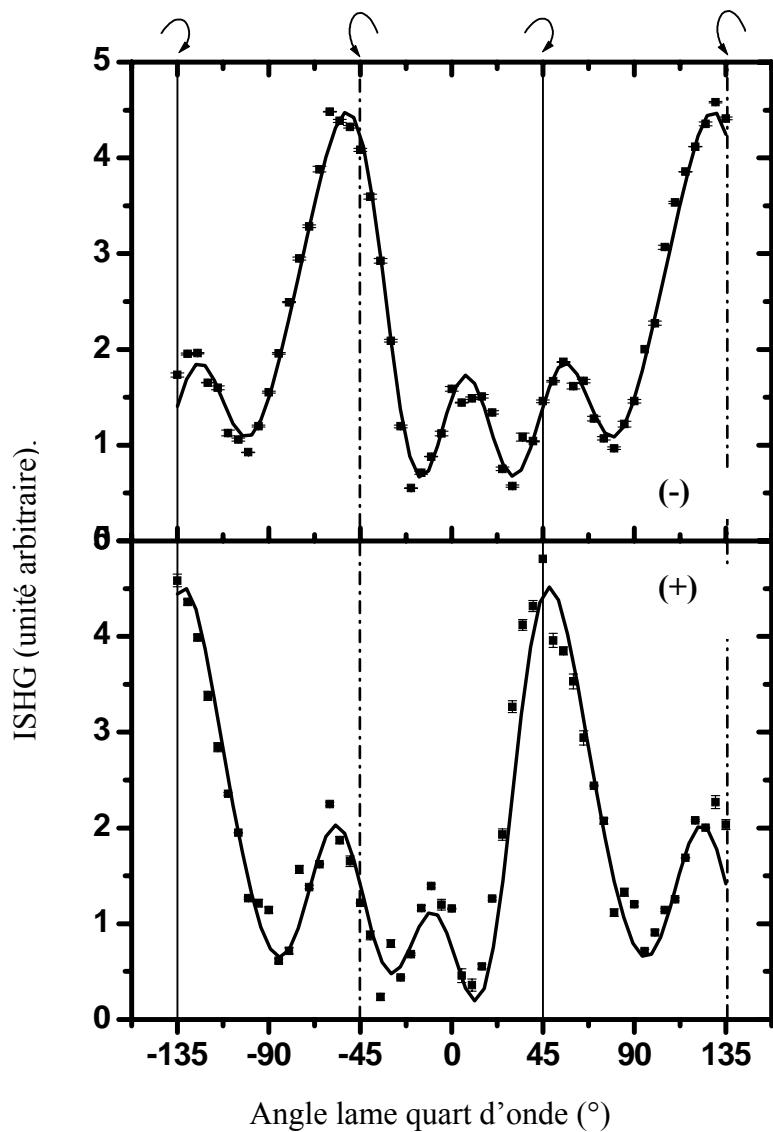
rotation, elle peut atteindre 30% au plus grandes longueurs d'onde. Le maximum de l'angle de rotation est voisin du maximum d'absorption de l'ASTB en solution dans l'éthanol. Il s'agit du plus grand angle mesuré à notre connaissance par cette technique.



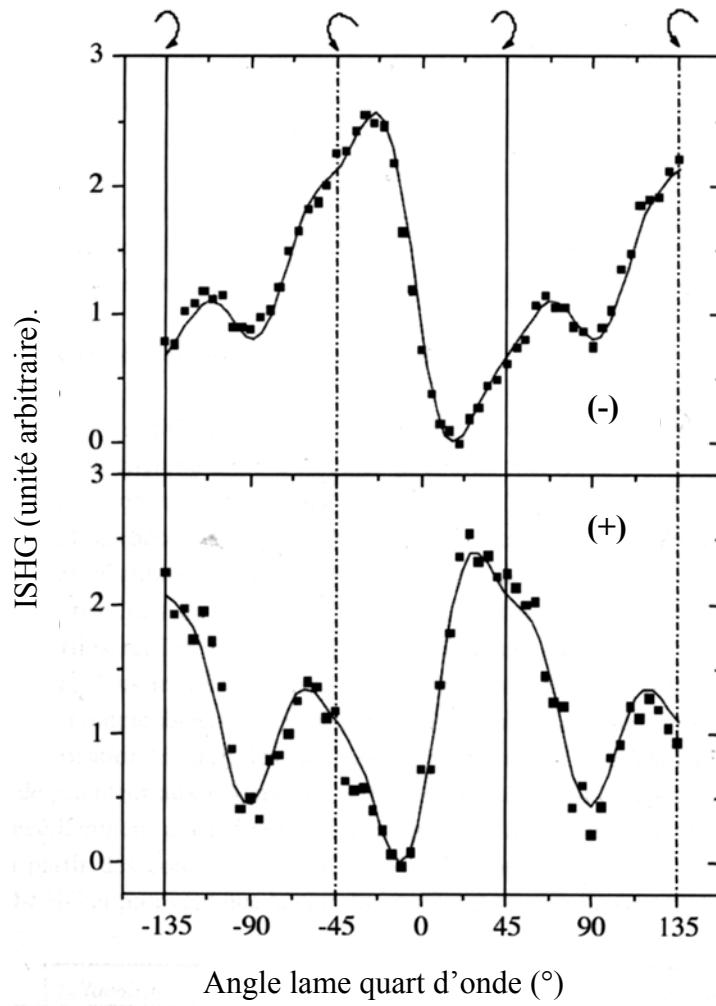
**Figure III)B.3 :** Spectre d'absorption (en pointillé) d'un film d'ASTB(-), d'une solution d'ASTB(-) dans l'éthanol( trait plein) et angle de rotation (étoile) du signal de second harmonique réfléchi par un film d'ASTB (-).

## ii. Expériences de CD

Les mesures du signal de SHG réfléchi par un film de chaque énantiomère, en fonction de l'angle azimutal d'une lame quart d'onde placée sur le faisceau incident (800nm), sont représentées sur la figure III)B.4 pour la composante de polarisation p du signal de second harmonique (400nm). La figure III)B.5 représente l'intensité du signal de SHG suivant la composante de polarisation s.



**Figure III)B.4 :** CD-p, Intensité du signal de second harmonique suivant la polarisation p, pour des films d'ASTB (-) (en haut), et d'ASTB (+) (en bas), en fonction de l'angle formé entre une lame quart d'onde et la polarisation incidente rectiligne. Les flèches circulaires indiquent l'état de la polarisation circulaire incidente droite ou gauche. La longueur d'onde du faisceau incident est de 800nm.



**Figure III)B.5 : CD-s, Intensité du signal de second harmonique suivant la polarisation  $p$ , pour des films d'ASTB (-) (en haut), et d'ASTB (+) (en bas), en fonction de l'angle formé entre une lame quart d'onde et la polarisation incidente rectiligne. Les flèches circulaires indiquent l'état de la polarisation circulaire incidente droite ou gauche. La longueur d'onde du faisceau incident est de 800nm.**

- Observations :

- Les courbes sont toutes dissymétriques par rapport à l'origine, cela témoigne de la présence de molécules chirales.
- Nous retrouvons sur les données expérimentales une périodicité de  $180^\circ$  suivant l'angle de la lame quart d'onde. Ceci est concordant avec l'expression I.B-39.

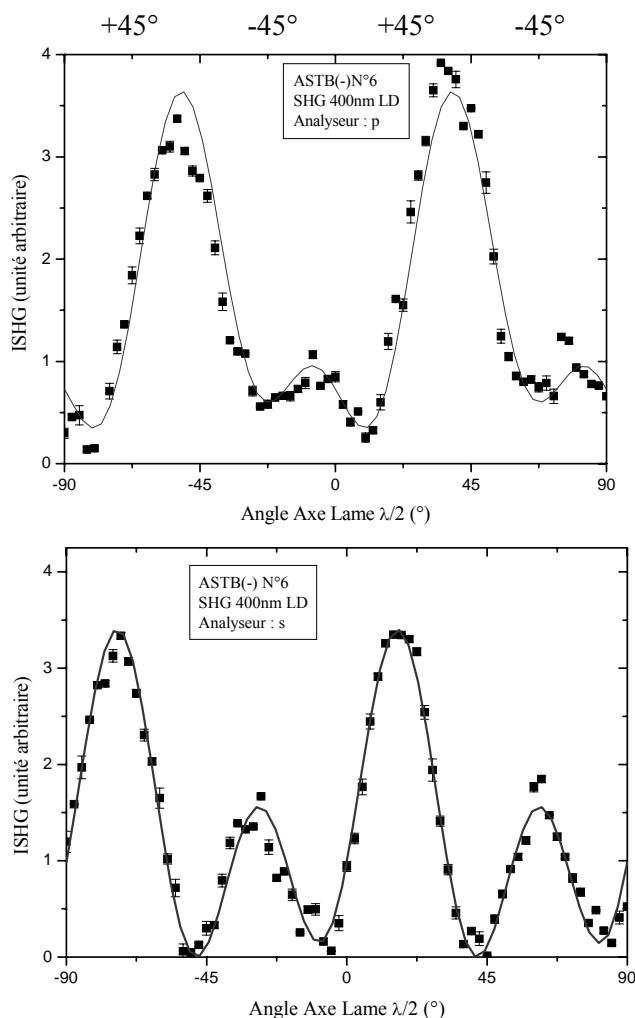
Cette périodicité traduit également l'alignement correct de l'expérience, et la non dégradation de l'échantillon durant la mesure.

- Les courbes d'un énantiomère sont opposées à celles de l'autre énantiomère par rapport à la position  $0^\circ$  de la lame quart d'onde.

- On mesure une différence circulaire de  $CD_p = -110\% \pm 20\%$  pour l'énanthiomère (+) pour composante suivant p et  $CD_s = -85\% \pm 15\%$  pour une polarisation s et le même énanthiomère (expression I.B-39).
- Pour l'autre énanthiomère (-), on mesure une différence circulaire  $CD_p = 95\% \pm 15\%$  pour une polarisation suivant la direction p et  $CD_s = 95\% \pm 15\%$  pour une polarisation suivant s.
- Les valeurs sont bien de même valeur absolue, aux valeurs de l'incertitude près, et changent de signe avec l'énanthiomère.

### iii. Expériences de LD

Les mesures du signal de SHG réfléchi par un film de l'énanthiomère (-) en fonction de l'angle azimutal d'une lame demi onde placée sur le faisceau incident (800nm) sont exposées sur la figure III)B.6 selon les polarisations p ou s.



**Figure III)B.6 :**  $LD_{p,s}$ , Intensité du signal de second harmonique suivant la polarisation p, pour des films d'ASTB (-) (en haut), et  $LD_s$  d'ASTB (-) (en bas), en fonction de l'angle formé entre une lame quart d'onde et la polarisation incidente. Les valeurs  $\pm 45^{\circ}$  en haut de la figure indiquent l'état de la polarisation rectiligne incidente. La longueur d'onde du faisceau incident est de 800nm.

- Observations :

- Les courbes ne sont pas symétriques par rapport à la position de  $0^\circ$  de l'axe de la lame. Il s'agit de la preuve d'une présence de molécules chirales.
- Nous retrouvons sur les données expérimentales une périodicité de  $180^\circ$  suivant l'angle de la lame demi onde. Ceci est cohérent avec l'expression I.B-40.

Cette périodicité témoigne d'un alignement correct de l'expérience, et d'une non dégradation du film.

- Pour l'énanthiomère (-), on mesure une différence linéaire pour la composante suivant la polarisation  $s$  de  $LD_s = 90\% \pm 15\%$ .

- Remarques :

- La courbe de  $LD_s$  obtenue pour l'autre énanthiomère présente la même symétrie que celle mentionnée auparavant pour les expériences de CD.
- On trouve pour l'énanthiomère (+)  $LD_s = -116\% \pm 15\%$ . Les valeurs de  $LD_s$  sont bien de signes opposés par rapport aux valeurs précédentes.
- La comparaison des valeurs  $LD_p$  entre les deux énanthiomère est plus délicate. Cela provient de l'incertitude importante liée à la détermination de la valeur de  $LD_p$  [Kauranen, 1998]. En effet, nous voyons sur la figure III)B.6 qu'il faut mesurer l'intensité du signal de SHG là où il est extrêmement faible ( $-45^\circ$ ), le bruit prend alors une importance majeure, et perturbe la détermination de  $LD_p$ .

A partir des ajustements proposés dans la partie B du chapitre I, nous allons pouvoir extraire de nombreuses informations sur les mécanismes physiques mis en jeu.

## iv. Activité optique

- Coefficients  $f$ :

A partir des mesures de d'ORD, obtenue sur la figure III)B.1 à 800nm et d'un ajustement donné par l'expression I.B-33 nous pouvons en déduire les valeurs des coefficients  $f_s$ ,  $f_p$ . Comme nous mesurons une intensité, le signal est mesuré à une phase près, c'est la raison pour laquelle nous choisissons arbitrairement de considérer  $f_p$  réel de valeur unitaire.

A partir des expériences d'ORD, l'ajustement fournit une valeur de  $f''_s$  nulle, et une partie réelle  $f'_s$  valant  $-1,12 \pm 0,07$ .

- Observations :

➤ Il est possible de comparer l'angle de rotation obtenu en SHG avec l'angle de rotation du plan de polarisation d'une lumière polarisée rectilignement traversant une cuve contenant une solution d'ASTB (dans le domaine linéaire). La densité surfacique des films étudiés vaut  $1,510^{-8}$  g/cm<sup>2</sup>. A partir du pouvoir rotatoire spécifique de l'ASTB(+) de -3080 ( $10^{-1}$  °cm<sup>2</sup>/g) à 546 nm, on trouve une rotation de l'ordre de  $3.10^{-5}$  ° pour une solution d'ASTB de concentration  $1,510^{-8}$  g/cm<sup>3</sup> contenue dans une cuve de 10cm. Nous avons mesuré une rotation de 13° à 475 nm (point le plus proche de 546 nm) dans l'expérience d'ORD-SHG, cette valeur est de 6 ordres de grandeur plus élevée que l'équivalent en optique linéaire pour le même nombre de molécules. Ceci vient du fait que dans les expériences d'ORD nous pouvons être sensibles aux termes exclusivement chiraux. Par exemple, d'après l'expression I.B-28 donne :

$$I_s(2\omega) \propto f_s^2 E_p^4(\omega)$$

$f_s$  ne contenant que des termes chiraux.

- Une valeur de rotation et de différence linéaire non nulles attestent (d'après les modèles invoqués au premier chapitre partie B) d'une chiralité résultant d'un couplage excitonique entre oscillateurs. Dès lors, l'activité optique trouve son origine dans des effets dipolaires électriques, et non dipolaires magnétiques ou quadrupolaires électriques.
- Si des effets dipolaires magnétiques ou quadrupolaires électriques étaient présents, ils seraient en quadrature de phase avec les composantes provenant

d'effets dipolaires électriques. Ceci correspondrait notamment à des valeurs complexes de  $f_s$ . En d'autres termes, la polarisation émergente du signal de SHG ne pourrait alors pas être rectiligne. Elle serait elliptique pour un faisceau incident polarisé p. Dans nos expériences, le signal de SHG est polarisé rectilignement, la polarisation a simplement tourné dans la base (s,p) par rapport au faisceau incident. La preuve en est l'extinction totale du signal de SHG pour certaines positions de l'analyseur. Ceci prouve l'influence mineure des contributions dipolaires magnétiques et quadrupolaires électriques dans les termes chiraux.

Les ajustements viennent confirmer ce résultat.  $f_s$  et  $f_p$  sont en phase, ce qui prouve l'importance des composantes dipolaires électriques (par rapport aux composantes dipolaires magnétiques ou quadrupolaires électriques).

- Comparaison avec le modèle local de couplage excitonique :

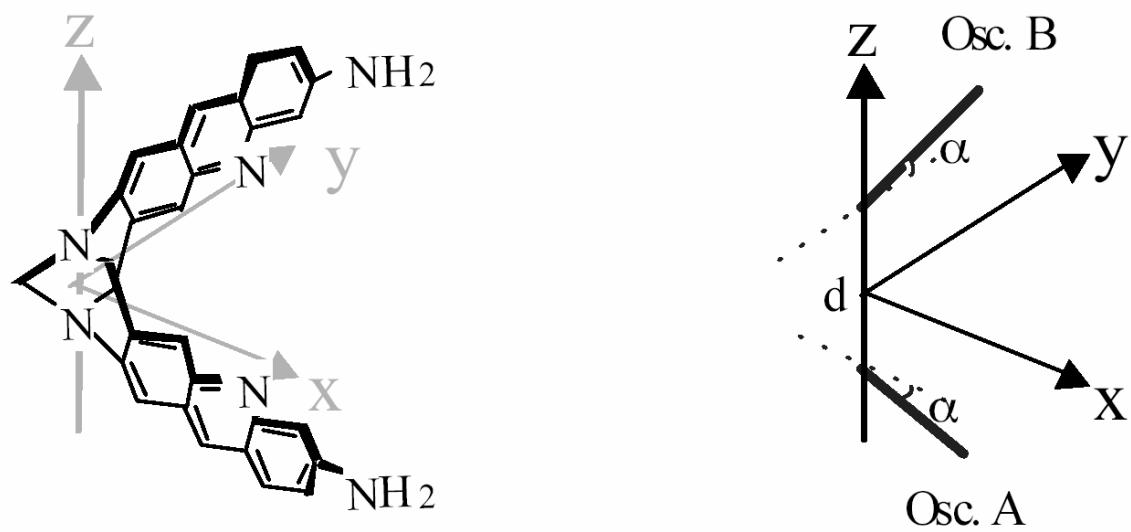
Fort de ces déductions, nous pouvons essayer de retrouver les valeurs de  $\Phi_{mp}$ , en utilisant le modèle d'oscillateurs couplés interagissant de façon locale avec le champ incident, développé au chapitre I, [Hache, 2003].

Si l'on suppose que l'ASTB se fixe par les deux groupements amines terminaux sur la surface, une relation entre  $\psi$  et  $\theta$  existe,  $\psi$  ne peut pas être considéré comme libre en prenant n'importe quelles valeurs entre 0 et  $360^\circ$ . Après divers essais, le choix de la valeur de  $\theta$  ne s'est pas montré déterminant dans la prédiction des valeurs de  $\Phi_{mp}$ . Une valeur de  $30^\circ$  est bien adaptée pour retrouver les résultats expérimentaux. Par contre, pour une valeur de  $\theta$ , il correspond une seule valeur de  $\psi$  ( $=-60^\circ$ ) qui est fixée par la géométrie moléculaire et les groupements reliés au substrat.

En utilisant les valeurs des distances entre les oscillateurs et de l'angle  $\alpha = 30^\circ$  que fait chaque dipôle avec l'axe Ox et Oy, il est possible d'estimer la valeur du potentiel d'interaction, et d'en déduire la valeur du paramètre km ( $14\text{J/m}^2$ ) (figure III)B.7). On estime la valeur de  $m\omega_0^2$

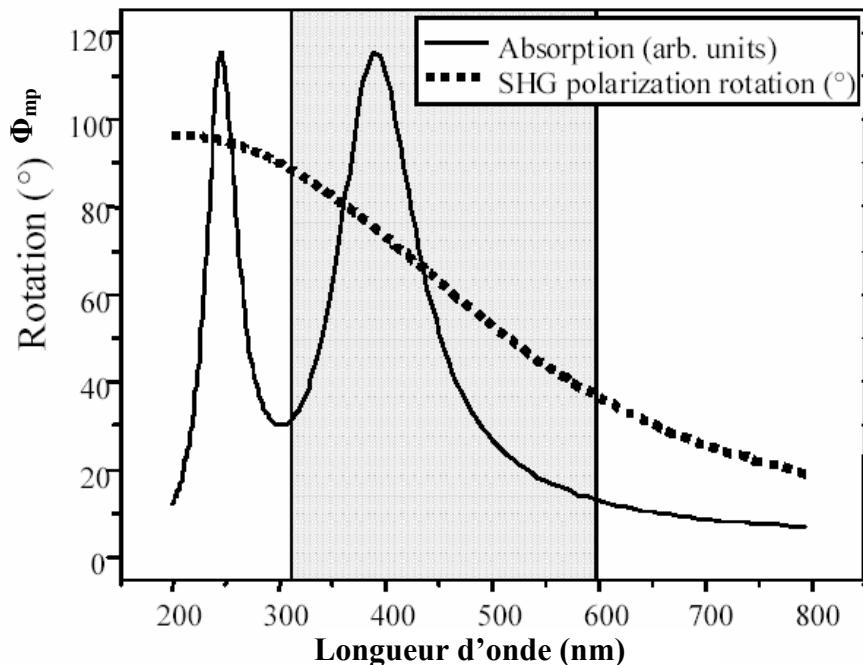
à  $40\text{J/m}^2$  à partir du spectre d'absorption. On obtient une valeur de  $\frac{\kappa}{\omega_0^2} \approx 0,35$ . Cette dernière

valeur correspond à un couplage fort. La présence des deux pics éloignés dans le spectre d'absorption témoigne justement d'un couplage intense entre les états propres de chaque oscillateur (l'écart entre les pics d'absorption est d'autant plus grand que le couplage est important).



**Figure III)B.7 :** représentation de l'ASTB dans le repère moléculaire et schématisation des oscillateurs couplés.

Les résultats de la simulation de l'angle de rotation  $\Phi_{\text{mp}}$ , et d'absorption sont représentés en fonction de la longueur d'onde sur la figure III)B.8.



**Figure III)B.8 :** Résultats de la simulation (modèle de Kuhn d'oscillateurs couplés en interaction locale avec le champ incident). La zone grisée correspond au domaine de longueur d'onde exploré expérimentalement.

Analyse :

- Nous constatons le bon accord avec les résultats expérimentaux. A 400nm la modélisation prévoit une rotation de 70° et le résultat expérimental est de 55° ± 10 °. A 360nm on prédit 80° alors que la mesure donne 64°± 3°. Ce résultat est d'autant plus satisfaisant que les prédictions sont basées sur un modèle phénoménologique relativement simple.
- Nous remarquons qu'il n'y a pas d'évolution brusque de la rotation au voisinage de la résonance, malgré des effets de résonance sur les coefficients  $f_p$  et  $f_s$ . Ceci vient du fait que l'on forme le rapport entre ces quantités pour obtenir la rotation  $\Phi_{mp}$ .

Nous trouvons expérimentalement que les termes dipolaires électriques sont dominants dans la molécule d'ASTB. La considération d'une interaction purement locale est parfaitement justifiée ici. En effet, dans notre géométrie, les termes d'origine chirale interviennent uniquement dans l'expression du tenseur  $\chi_{123}^{eee}$  local, et ceux achiraux sont aussi présents dans la susceptibilité locale. Nous avons montré expérimentalement que les termes dipolaires magnétiques quadrupolaires électriques ont une importance mineure. Il est donc justifié de ne pas les considérer dans le modèle utilisé. Ceci est également en accord avec une estimation de l'ordre de grandeur des termes non locaux. Ils sont de 3 ordres de grandeurs inférieurs aux termes locaux. En effet, ils sont en rapport  $\lambda/d$  (locaux/non locaux), avec ici  $d=1\text{\AA}$  et  $\lambda=8000\text{\AA}$ .

Conclusion :

Nous avons pu observer la très grande sensibilité de la génération de second harmonique en surface à la chiralité moléculaire. Cette sensibilité est sans commune mesure avec celle rencontrée en optique linéaire. Ceci est la résultante de deux phénomènes.

Le premier est qu'il est possible, dans les molécules chirales, où il existe un couplage excitonique, d'obtenir des contributions à l'activité optique d'origine dipolaire électrique (résultantes d'une interaction locale entre le champ et la molécule d'ASTB). Cette contribution est de plusieurs ordres de grandeur (3 dans notre exemple) supérieure aux effets

d'origine dipolaire magnétique et quadrupolaire électrique (tous deux résultats d'une interaction non locale avec le champ extérieur) qui sont les seuls à contribuer à l'activité optique en optique linéaire.

Le second phénomène tient à la géométrie surfacique adoptée. Par un jeu adéquat de polarisations nous pouvons être particulièrement sensibles aux termes chiraux. Ceci est d'autant plus efficace que le moyennage orientationnel sur une surface permet d'ajouter les différentes hyperpolarisabilités et non de les soustraire comme c'est le cas dans les liquides [Belkin, 2001].

Une rotation et une valeur de LD non nulles permettent à elles seules de trancher en la faveur d'un couplage entre oscillateurs ou bien d'un mouvement hélicoïdal des charges. Elles sont la signature d'une chiralité provenant d'un couplage excitonique. Nous sommes donc sensibles à l'origine de la chiralité dans nos expériences. De plus, c'est la première fois que nous validons expérimentalement le modèle Kuhn étendu au non linéaire. Ce modèle nous permet de retrouver qualitativement les résultats des expériences d'ORD de CD et de LD. En faisant une hypothèse très simple sur le dépôt des molécules, notre modèle nous permet de retrouver quantitativement nos résultats. L'utilisation de l'ASTB en microscopie comme marqueur membranaire chiral peut alors être étudiée dans la partie suivante.



### III) C. Utilisation de l'ASTB en microscopie

Au chapitre I dans la partie D, nous avons précisé les propriétés que doit posséder un colorant pour la microscopie non linéaire. Nous allons donc étudier les propriétés de l'ASTB en temps que marqueur membranaire. Nous nous intéressons, tout d'abord, à son insertion membranaire dans des vésicules géantes ou des cellules épithéliales, à partir des images de TPEF. générées lorsque l'ASTB est insérée dans les membranes modèles de vésicules, nous discutons son orientation. L'imagerie de SHG sera abordée dans un deuxième temps. Nous présentons aussi un exemple de suivi de déformation d'un nœud de Ranvier pour illustrer la viabilité de ce type de marqueur.

#### i. Insertion membranaire

Nous avons déjà mentionné la très faible solubilité de l'ASTB dans l'eau. Sa solubilité dans l'éthanol ou le DMSO n'est pas compatible avec une utilisation en biologie où ces solvants détruisent les membranes naturelles. Il faut donc proposer une méthode de marquage non destructive en mettant en contact l'ASTB avec les membranes.

- Marquage à l'aide de cristaux insolubles :

La première méthode consiste donc à faire interagir le colorant sous forme solide avec les objets naturels ou artificiels à colorer. Des grains d'ASTB peuvent être mis dans une solution aqueuse contenant les cellules, et une légère agitation facilite les échanges entre les cristaux d'ASTB et les membranes. Le mouvement de convection ne doit pas être trop brusque sous peine de détérioration des cellules. Cette méthode s'est révélée expérimentalement être efficace, mais de nombreux grains restent en solution et masquent l'observation des membranes en raison du signal très intense qu'ils génèrent en microscopie non linéaire.

- Marquage par l'intermédiaire du glucose :

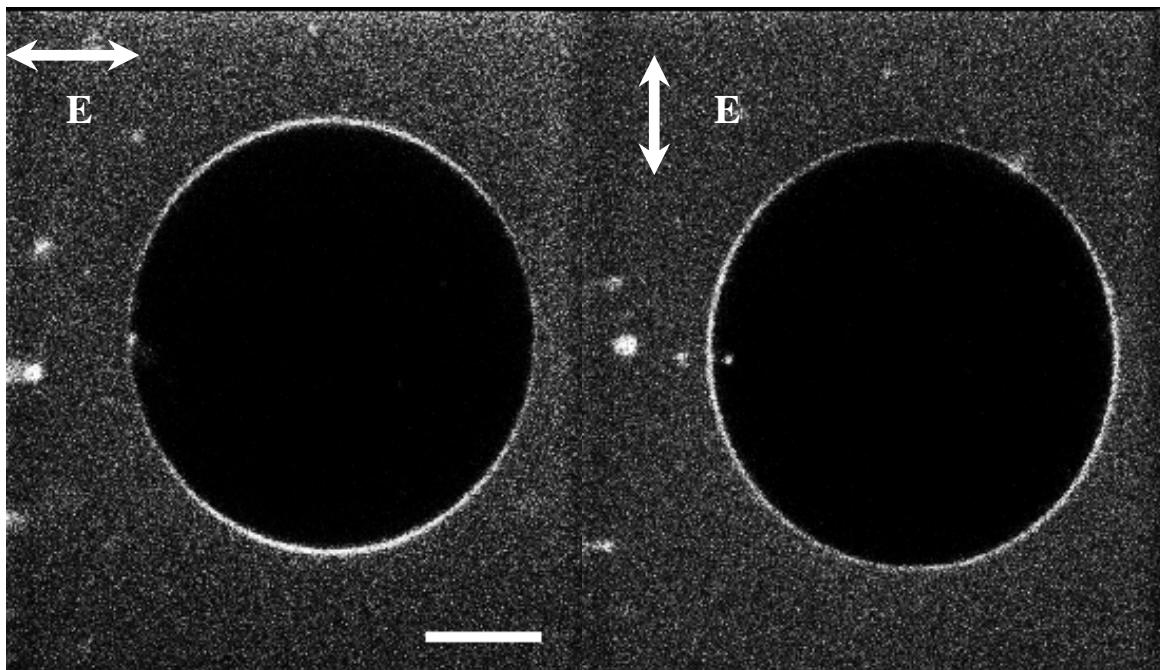
Expérimentalement, nous avons mis au point une seconde méthode plus performante. Elle utilise le fait que l'ASTB est soluble en milieu aqueux lorsque celui-ci contient du glucose. L'ASTB adopte alors sa forme acide et très probablement, il forme un complexe avec le glucose. De plus, l'ASTB conserve, *a priori*, sous cette forme une bonne affinité pour les

membranes. Une partie de l'ASTB complexée ira s'insérer dans les membranes. L'utilisation du glucose dans les milieux biologiques ne pose aucun problème de toxicité. Il suffit ensuite de diluer la solution avec de l'eau pure ou de l'eau contenant du sucre (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>, l'ASTB étant insoluble dans le sucre) pour rincer, en quelque sorte, la solution. La concentration en ASTB devenant ainsi plus faible dans le bain, et restant invariante dans les membranes, un signal provenant spécifiquement des membranes pourra alors être observé. Notons que cet argument n'est valable que pour des applications en fluorescence excitée à deux photons et non en SHG. Dans ce dernier cas le contraste ne nécessite aucun rinçage, puisque le bain (même constitué de molécules chirales) ne peut générer aucun signal de second harmonique. Le glucose sert d'agent de transfert de phase (comme les cyclodextrines avec d'autres colorants comme les ANEPPS, [Moreaux, 2002]), il permet de solubiliser l'ASTB dans une phase aqueuse, et de la transférer vers une phase lipidique membranaire.

Nous présentons sur la figure III)C.1 un exemple de GUV marquée par un énantiomère de l'ASTB(-). Il s'agit d'une image réalisée en TPEF. Nous avons ajouté à la solution de GUVs (DOPC) une solution saturée en ASTB dans du glucose à 0,1mol/L. Les vésicules contiennent une solution de sucre à 0,1mol/L. Le mélange est ensuite rincé 2 fois avec une solution aqueuse de sucre à 0,1mol/L. Il faut toujours utiliser des solutions de même concentration en sucre afin d'éviter tout choc osmotique. Le rinçage avec de l'eau pure ne serait donc pas possible ici.

La préparation est observée avec le microscope à balayage décrit dans la partie C du chapitre II. Nous utilisons un objectif à immersion à eau Olympus 60X d'ouverture numérique 0.9. Le signal de fluorescence est collecté vers l'arrière au travers d'un filtre E700sp et HQ535. Nous utilisons deux polarisations rectilignes incidentes à 90° l'une de l'autre. Les états de polarisation sont représentées par une double flèche blanche sur la figure III)C.1. La longueur d'onde du laser incident est de 800nm et la puissance au foyer de l'objectif est de 30mW.

Une image de vésicules identiques sans colorant a été réalisée, les membranes des vésicules sont invisibles en TPEF en l'absence de coloration. Il n'y a pas de fluorescence naturelle des membranes dans la zone spectrale considérée (excitation à 400nm et observation entre 500 et 550nm).



**Figure III)C.1 :** Image de fluorescence à deux photons d'une vésicule unilamellaire géante (DOPC, en solution dans du glucose[0,1mol.L<sup>-1</sup>], contenant du sucre[0,1mol.L<sup>-1</sup>] et marquée par le colorant ASTB (-)) pour deux directions orthogonales de polarisation du laser (indiquée par la double flèche). Puissance d'excitation 30mW à 800nm. Temps d'acquisition 0,6s. Echelle de longueur 14μm. Filtre utilisé HQ535. Objectif 60X ON : 0.9 à immersion dans l'eau.

- Observations :

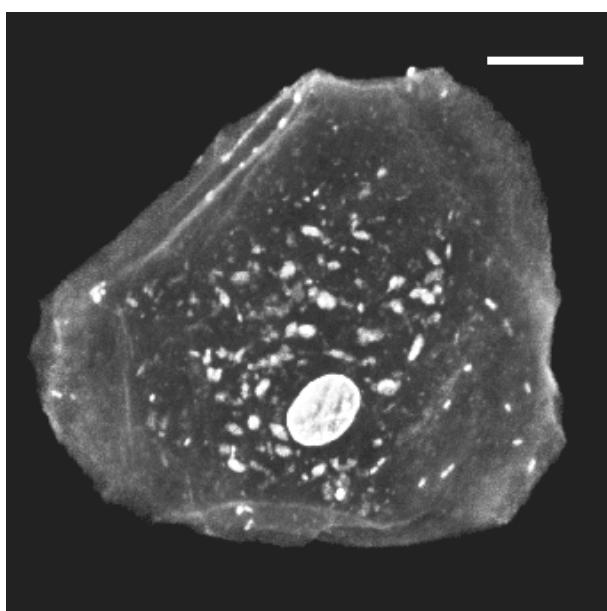
- Nous observons que la membrane des vésicules ressort particulièrement contrastée du bain ( $C=1,8$  par rapport au bain). Le marquage par l'intermédiaire du glucose est donc un procédé efficace. Ce contraste peut être amélioré en augmentant la dilution de la solution (par ajout d'une solution de sucre) contenant les vésicules. La concentration en marqueur dans le bain extérieur sera ainsi réduite, le signal de TPEF de cette zone diminuera alors que celui provenant de la membrane ne sera que très peu modifié. Ce résultat expérimental est la traduction d'une meilleure affinité de l'ASTB pour les membranes que pour une solution aqueuse de sucre.
- L'intérieur des vésicules contenant du sucre, l'ASTB n'y est pas soluble. Ceci explique l'absence totale de signal de fluorescence provenant de cette zone (Contraste=5,5 entre la membrane et l'intérieur).
- On observe encore quelques grains de colorant très lumineux sur l'image, ceux-ci proviennent d'un filtrage imparfait de la solution saturée de glucose contenant le colorant.

- Les observations en lumière polarisée montrent que les deux polarisations ne sont pas équivalentes. Pour une polarisation horizontale, les pôles émettent une intensité plus grande qu'à l'équateur (rapport de 2,5 en moyenne sur plusieurs pixels de chaque zone). Pour une polarisation incidente verticale, c'est l'inverse.

Observons comment l'ASTB interagit avec une membrane naturelle, celle d'une cellule épithéliale humaine.

- Coloration d'une cellule épithéliale :

Des cellules épithéliales sont prélevées sur la paroi interne de la joue, puis sont déposées dans une boîte de Pétri contenant 0,5mL d'eau distillée. Les cellules sédimentent au fond de la boîte. Un ajout d'une solution aqueuse saturée d'ASTB de 50 $\mu$ L contenant 0,1mol/L de glucose est effectué pour colorer les cellules. Après un temps d'attente d'une dizaine de minutes, la préparation est observée sous une excitation à 800nm (15mW), la fluorescence est détectée à travers un filtre HQ535. Un objectif de grossissement 60X est utilisé en immersion dans la préparation. L'image obtenue est présentée sur la figure III)C.2, elle résulte de la projection du maximum d'intensité d'une pile de 50 images réalisées tous les microns.



**Figure III)C.2 :** Image de cellule épithéliale humaine colorée avec l'ASTB(-). Projection de l'intensité maximale à partir de 50 images espacées de 1 $\mu$ m (épaisseur=50 $\mu$ m). Puissance d'excitation 15mW. Temps d'acquisition 2s par image. Echelle de longueur : 14 $\mu$ m. Non rincée. Excitation 800nm. Filtre HQ535. Objectif 60X à immersion à eau.

- Nous observons une nouvelle fois l'efficacité de l'ASTB pour le marquage membranaire. Il s'agit ici de membrane naturelle et non artificielle.

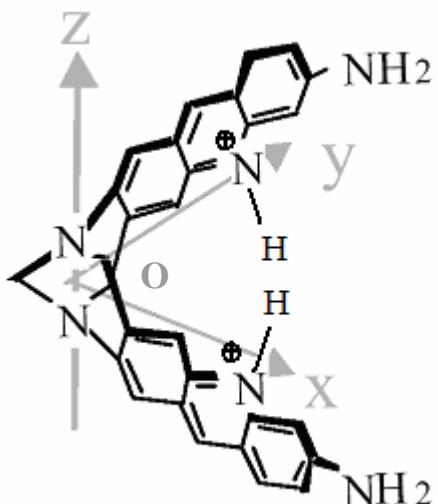
- Le colorant s'est bien inséré dans la membrane externe de la cellule, mais il a également marqué les membranes des organelles internes de la cellule.
- Il colore de façon très efficace le noyau de la cellule qui ressort clairement.
- Comme il colore l'intérieur des cellules, il diffuse donc facilement à l'intérieur de celle-ci. Le temps de diffusion est inférieur à une dizaine de minutes. Les membranes cellulaires sont donc perméables à l'ASTB.

Utilisons ces informations pour discuter l'orientation de l'ASTB à la surface des vésicules.

- Comme l'ASTB diffuse à travers les membranes naturelles, il est possible d'émettre deux hypothèses sur la position des molécules de colorant par rapport à la bicouche lipidique. La première hypothèse considère l'ASTB sous forme chargée (forme acide). Dans ce cas, il existe des interactions électrostatiques entre les charges du colorant et celle des têtes des phospholipides (l'atome d'azote à l'extrémité de la tête polaire est chargé positivement et un atome d'oxygène est chargé négativement). A l'opposé, les atomes d'azote chargés du colorant sont en interaction répulsive avec les chaînes carbonées des lipides (neutres et apolaires) et il est peu probable que le colorant s'insère à l'intérieur de la bicouche à proximité des chaînes carbonées. Ceci implique que l'ASTB se dispose sur les surfaces interne et externe de la membrane du côté des têtes polaires des lipides. Cependant, la disposition précise du colorant par rapport aux têtes des phospholipides ne peut être déterminée sans études complémentaires. Nous pouvons considérer, dans une seconde hypothèse que l'ASTB réagit pour retrouver une forme neutre. Il est alors possible d'envisager une insertion du colorant entre les deux monocouches.
- L'ASTB ne s'insère pas de façon aléatoire dans les membranes, autrement tout le périmètre de la vésicule rayonnerait un champ identique quelque soit l'état de la polarisation incidente.

Les observations en lumière polarisée nous permettent d'émettre différentes hypothèses sur l'orientation de l'ASTB vis-à-vis de la surface. Nous pouvons envisager que le plan ( $xoy$ ) (dans le repère moléculaire voir : figure III)C.3) est approximativement normal au plan de la membrane. Considérons un dipôle dans le plan de chaque chromophore ( $xoz$ ) et ( $yoz$ ), aux pôles, chaque dipôle

formerait un angle important avec le champ électrique incident horizontal et ils formeraient un angle de faible valeur à l'équateur (figure III)C.1 gauche). L'excitation serait alors beaucoup plus efficace à l'équateur qu'aux pôles. Dans cette hypothèse, les zones polaires seraient plus lumineuses que les zones équatoriales. Cette hypothèse est donc en désaccord avec les observations réalisées sur les vésicules géantes (figure III)C.1 gauche). Nous pensons donc que l'insertion du colorant dans la membrane se fait avec un angle faible entre le plan ( $xoy$ ) et le plan de la membrane. Cette hypothèse est en accord avec une intensité rayonnée importante aux pôles (angle faible entre les dipôles et le champ incident) et une intensité faible à l'équateur (angle important entre les dipôles et le champ incident) dans le cas une excitation horizontale.



**Figure III)C.3 :** formule semi développée de l'ASTB (sous forme chargée) dans le repère moléculaire. La forme neutre ne possède pas les deux atomes d'hydrogène fixés aux atomes d'azote qui deviennent alors neutres.

Conclusion :

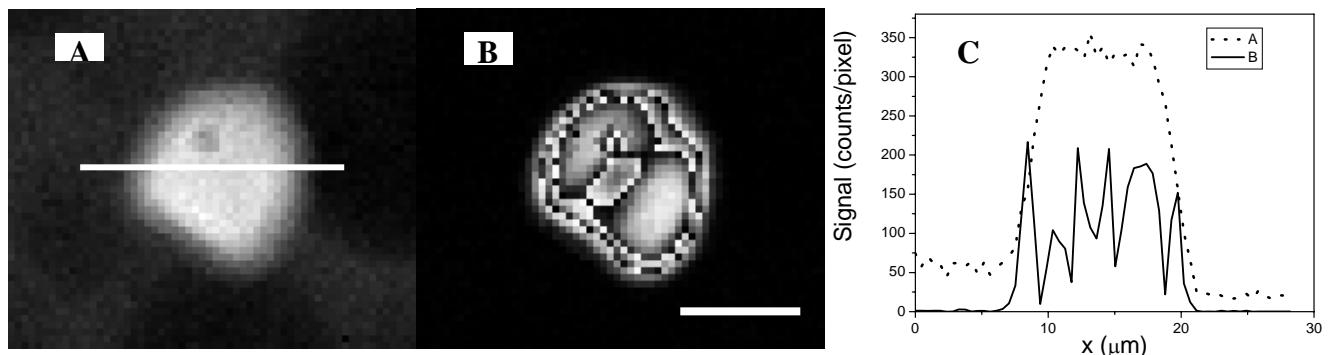
l'ASTB s'insère efficacement dans les membranes phospholipidiques naturelles ou artificielles. Les bicouches lipidiques sont perméables à l'ASTB. Les images obtenues en lumière polarisée indiquent que les molécules d'ASTB sont orientées parallèlement au plan de la membrane (plan ( $xoy$ ) parallèle au plan membranaire). Leur disposition exacte est cependant difficile à déterminer uniquement à partir d'expériences d'optiques. Des calculs de constantes d'acidité ( $pK_a$ ) à l'intérieur de la membrane sont en cours dans l'équipe de C. Andraud pour déterminer si l'ASTB pénètre bien à l'intérieur de la bicouche.

## ii. Imagerie de second harmonique

Nous allons présenter les résultats obtenus en imagerie de second harmonique. A partir du modèle introduit pour retrouver les résultats expérimentaux d'ORD-SHG, nous allons calculer les composantes de la susceptibilité d'ordre 2 résultant de différentes orientations du colorant par rapport à la membrane. Nous pourrons alors comparer ces résultats à ceux déduits de l'observation des images de TPEF précédentes.

- Observation d'un grain de colorant :

Nous avons imagé un grain de colorant d'ASTB (-) dans les mêmes conditions que dans les expériences précédentes. L'image obtenue est présentée sur la figure III)C.5. Nous avons évalué les profils de l'intensité émise le long d'une ligne médiane traversant le grain de colorant. Les résultats sont présentés sur la figure III)C.3.C.



**Figure III)C.5 :** A : fluorescence (TPEF) d'un grain de colorant d'ASTB(-). B : Image de second harmonique. C : Profil de l'intensité détectée le long de la ligne dessinée en blanc. Objectif 60X Olympus O.N. : 0.9 à immersion à eau. Excitation 860nm. Puissance du laser : 50mW, temps d'acquisition 10μs/pixel. Filtre interférentiel HQ430/20 (B), Filtre HQ535(A). Barre d'échelle 7μm.

- Remarques :

- Un cristal de colorant d'ASTB(-) génère bien un signal de second harmonique.
- Celui-ci étant cohérent, des d'interférences ont lieu entre les différents centres émetteur ce qui donne à l'image de SHG une structure non observable en TPEF (cf figure III)C.3.C).
- On remarque que le contraste en SHG est supérieur à celui obtenu en TPEF. On observe sur le graphique C, un fond continu de 50 photons par pixel en moyenne en TPEF, alors que ce nombre tend vers 0 pour le fond de SHG.

- Observation des vésicules en SHG avec un énantiomère de l'ASTB :

Nous nous plaçons dans les mêmes conditions expérimentales que pour les images présentes de la figure III)C.1, et cherchons à détecter un signal de SHG en transmission à travers un filtre interférentiel à 400nm. Nous ne détectons pas de signal de SHG.

En raison de la présence d'un signal de second harmonique provenant d'un grain de colorant, il est légitime de penser que c'est la disposition de l'ensemble des molécules de colorant illuminées à la surface de la membrane qui est à l'origine de l'absence de signal de SHG dans les vésicules. Le signal de SHG provenant d'un phénomène cohérent (à la différence de celui de TPEF) il faut tenir compte de l'organisation de l'ensemble des molécules pour interpréter l'absence de ce signal. Nous considérons pour cela, de nouveau, le modèle introduit au chapitre I (valider dans la partie précédente) pour rendre compte de l'activité optique d'un film de colorant en SHG [Hache, 2003]. Cette fois, nous étudions l'effet de l'angle  $\theta$  sur les composantes de la susceptibilité d'ordre 2. Une valeur de  $\theta$  fixe l'angle  $\psi$ , et nous sommes sensibles à l'effet du moyennage suivant  $\varphi$ .

Nous trouvons, en accord avec le raisonnement mené dans la partie C du chapitre I que les composantes achirales dipolaires électriques changent de signe si l'on effectue une symétrie par rapport au plan de la membrane quelque soit l'angle  $\theta$ . Les composantes dipolaires électriques achirales s'annulent donc pour l'ensemble de la bicouche. Les composantes chirales dipolaires électriques sont de même signe, elles s'ajoutent donc constructivement

pour l'ensemble de la membrane. Nous étudions l'influence de  $\theta$  sur la composante  $\chi_{\equiv xyz}^{(2)}$  (chirale). Les résultats sont présentés dans le tableau III)C.1.

$\theta$ ( $^{\circ}$ )	10	20	30	40	50	60	70	80	90
$\chi_{\equiv xyz}^{(2)}$	1	1,5	2,4	3,4	4,4	5,5	6,3	6,9	7,1
(u.a.)									

**Tableau III)C.1 :** résultats de la simulation sur la composante  $\chi_{\equiv xyz}^{(2)}$  en fonction de  $\theta$ .

Nous voyons que dans le cas où le plan (xoy) se rapproche du plan membranaire ( $\theta = 10^{\circ}$ ), comme nous l'avions proposé à partir de l'analyse du signal de fluorescence, la composante  $\chi_{\equiv xyz}^{(2)}$  est de valeur très faible par rapport au cas où le plan (xoy) est normale à la surface ( $\theta = 90^{\circ}$ ). Il y a un rapport 7,1 entre les composantes correspondant à chacune de ces cas, et dont un rapport 50 sur l'intensité du signal de SHG. Nous pensons donc que c'est une orientation des molécules avec un angle  $\theta$  de faible valeur qui lors du moyennage orientationnel des hyperpolarisabilités, conduit à une valeur de  $\chi_{\equiv xyz}^{(2)}$  faible. Ceci permet d'expliquer l'absence de signal de SHG rayonné par les membranes colorées par l'ASTB, en accord avec l'orientation proposée à partir des expériences de TPEF.

### iii. Toxicité

La toxicité de l'ASTB a été testée sur plusieurs types de cellules. Nous avons imaginé différentes cellules isolées du tissus de la grenouille en présence d'ASTB : cellules cardiaques auriculaires, fibre musculaire isolée, nœud de Ranvier du nerf sciatique. Nous n'avons pas détecté de modification morphologique entre les images en lumière incohérente en transmission et celles obtenues après coloration en TPEF.

Ce même type d'expériences n'a montré aucune variation morphologique des cellules épithéliales humaines lors d'une illumination à 800nm et avec une puissance de 15mW (figure III)C.2).

L'enregistrement des potentiels de repos et d'action du tissu auriculaire de grenouille indiquent que l'ASTB (aux concentrations de 1, 10 et 50 $\mu$ mol/L) n'affecte pas le potentiel de repos et ne modifie pas significativement la durée du potentiel d'action.

Conclusion :

L'ASTB est donc un colorant non toxique pour l'imagerie de cellules excitables. Aux concentrations utilisées, il apparaît bien adapté pour mener des études morphologiques cellulaires puisqu'il n'induit aucune déformation.

- Photostabilité :

Au cours des expériences sur un grain de colorant nous n'avons observé aucune dégradation du signal de TPEF ou de SHG, et cela sous une illumination de 50mW au foyer ce qui correspond à une intensité de  $4.10^4\text{W/cm}^2$  (répartition de la puissance sur un diamètre de 400nm au foyer de l'objectif 60X) à raison de 10 $\mu\text{s}$  d'éclairement par pixel, et d'une exposition discontinue (20 images) de 200 $\mu\text{s}$  par pixel. Ces paramètres sont des majorants de ceux utilisés typiquement en imagerie cellulaire surtout en ce qui concerne la puissance incidente.

Pour les images de cellules épithéliales figure III)C.2, une exposition à une intensité de  $1,210^4\text{W/cm}^2$  pour 10 $\mu\text{s}$  d'exposition par pixel et d'un temps total de 50 $\mu\text{s}$  (5 images) par pixel, ne modifie pas l'intensité du signal de TPEF. Dans les mêmes conditions, un colorant comme le RH237 (Molecular Probes) émet une intensité de SHG diminuée par un facteur 2 après 5 expositions successives.

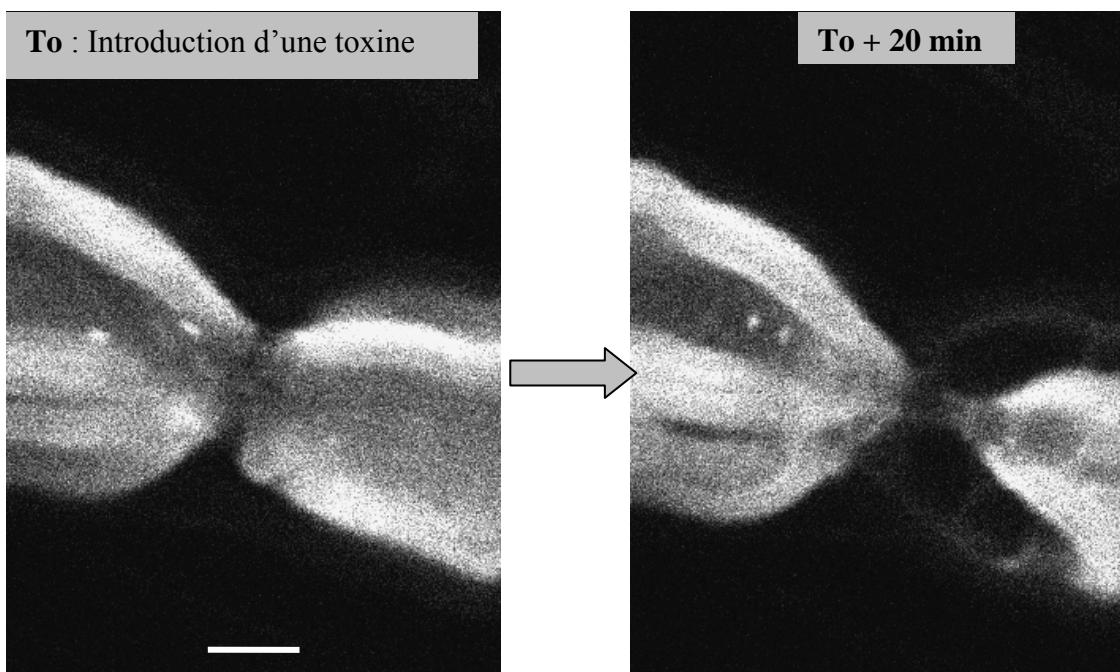
Ceci prouve une exceptionnelle photostabilité de la molécule d'ASTB aux intensités requises en microscopie. La grande robustesse de sa structure chimique (cycles des proflavines et pont diazocine) explique ce résultat.

#### iv. Exemple

L'ASTB va être maintenant utilisée sur un nœud de Ranvier. Cet exemple montre la possibilité d'un suivi temporel de la déformation de cette structure après l'introduction d'une toxine.

- Déformation d'un nœud de Ranvier :

Nous proposons un exemple d'utilisation de l'ASTB comme marqueur membranaire sur un nœud de Ranvier (provenant du nerf sciatique de patte de grenouille). Il s'agit d'une zone de la fibre nerveuse où la gaine de myéline s'interrompt. Nous allons suivre la déformation de cette zone après introduction d'une toxine. Le résultat est présenté sur la figure III)C.6. L'excitation a lieu à 430nm, avec 30mW de puissance incidente.



**Figure III)C.6 :** Nœud de Ranvier d'un fibre nerveuse du nerf sciatique de patte de grenouille colorée par l'ASTB  $5.10^{-5}$  mol/L. TPEF (HQ535 et E700sp.) Puissance d'excitation 30mW 860nm. Echelle de longueur : 20 $\mu$ m.

- Observations :
  - L'ASTB a bien marqué la gaine de myéline.
  - On remarque que la fibre nerveuse n'est pas colorée par l'ASTB.
  - Certains points apparaissent plus lumineux, il s'agit peut-être de noyaux de cellules.

Conclusion :

L'ASTB est un marqueur membranaire très polyvalent. Il permet de colorer de nombreux types de cellules, son efficacité et sa grande stabilité en TPEF permettent des études morphologiques en microscopie non linéaire.

Nous allons proposer différentes voies d'amélioration de l'ASTB comme perspectives de ce travail expérimental.

### III) D. Perspectives

Nous avons vu dans la partie C de ce chapitre, concernant les applications de l'ASTB en microscopie, que ce colorant se révélait très peu toxique, doué d'une très bonne insertion membranaire accompagné d'une excellente photostabilité. Par contre, son orientation sur la membrane est un élément défavorable pour la génération d'un signal de second harmonique. A cela il convient d'ajouter une faible efficacité intrinsèque en SHG du colorant provenant de sa structure chimique.

#### i. Efficacité en SHG

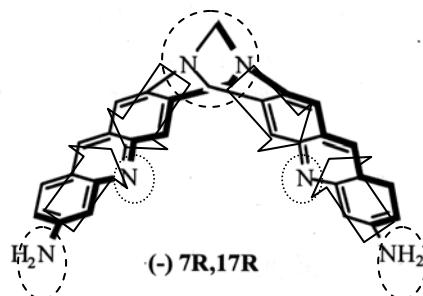
L'ASTB a été synthétisée dans une but précis : former un ensemble chiral de deux chromophores interagissant par couplage excitonique. Pour viabiliser ce colorant, il faut synthétiser de nouvelles molécules sur la base de l'ASTB mais possédant une efficacité de SHG supérieure. Pour observer un signal de SHG provenant d'une membrane cellulaire, deux aspects sont à considérer : l'efficacité intrinsèque du colorant et l'efficacité d'un ensemble de molécules contenues dans le volume d'excitation. Ce dernier aspect est indissociable de son insertion membranaire et sera traité dans une seconde partie.

La faible efficacité de l'ASTB en SHG peut s'expliquer par un moment dipolaire dans l'état excité de faible valeur. Si l'on considère la structure de l'ASTB (figure III)D.1), les groupements amines et les atomes d'azotes du pont diazocine sont donneurs d'électrons (électrons du doublet libre de l'azote). L'atome d'azote de la pyridine (en jaune) est accepteur suivant les valeurs du pH. Sur chaque bras de la molécule les cycles sont plans et permettent une délocalisation des charges d'un groupement à l'autre. D'autre part, le passage de charges d'une proflavine à l'autre est impossible via le pont diazocine. En outre, ces groupements ne contribuent pas à la délocalisation d'une charge importante, il faudrait par exemple préférer à un groupement amine ( $\text{NH}_2$ ) un groupement nitrés ( $\text{NO}_2$ ), ce dernier possédant une charge négative délocalisable beaucoup plus grande.

Une telle molécule n'est pas un produit commercial, chaque molécule nécessite un important travail de recherche en synthèse asymétrique qui ne répondra pas forcément à toutes nos attentes.

Un groupement nitro à la place d'un groupement amine, doit forcément modifier la réactivité du colorant vis-à-vis des composés présent dans les cellules. Rien n'indique qu'un colorant plus efficace pour le second harmonique ne sera pas un véritable poison pour la cellule (toxicité éventuelle de  $\text{NO}_2^-$ ).

Une autre voie à explorer pour améliorer l'efficacité de ce colorant serait d'augmenter la valeur du moment dipolaire dans l'état excité, non pas en augmentant la valeur de la charge, mais en augmentant la taille du dipôle. Pour cela, une voie envisagée serait d'augmenter la distance séparant les groupes donneurs d'électrons des groupes accepteurs. Il faudrait utiliser des molécules planes (pour assurer la délocalisation) plus longues que les proflavines actuelles. Ces structures pourraient permettre, en outre, une meilleure insertion membranaire.



**Figure III)D.1 :** forme semi développée de l'ASTB(-), où les groupements accepteurs d'électrons sont cerclés en pointillés fins, et les donneurs entourés de gris..

## ii. Insertion membranaire

- Moyennage orientationnel favorable :

Si les nouveaux composés construits sur la base de l'ASTB possèdent une grande efficacité intrinsèque en SHG, mais qu'ils se déposent comme l'actuelle molécule sur les membranes, il est très probable que le signal de SHG émis par la membrane colorée sera relativement faible du fait d'un moyennage des hyperpolarisabilités en des susceptibilités d'ordre 2 de faible valeur (cf. tableau III)C.1). Nous avons montré que pour des molécules suivant le modèle de l'ASTB une orientation normale entre le plan ( $xoy$ ) et celui de la membrane permet un moyennage orientationnel conduisant à une valeur de la susceptibilité bien supérieure ( $\theta = 90^\circ$  dans le tableau III)C.1).

De plus, si les moments dipolaires de la molécule sont normaux à la surface membranaire, ils seront colinéaires au champ électrique statique. Cette configuration permet une meilleure sensibilité au champ transmembranaire qui est une qualité précieuse pour créer un marqueur sensible au potentiel.

Il paraît donc essentiel que ce marqueur s'insère transversalement à la membrane comme c'est le cas pour d'autres colorants comme les ANEPPS [Moreaux, 2002]. Il est donc important que les futures molécules possèdent des groupements permettant une orientation membranaire différente.

- Insertion grâce à des chaînes carbonées :

L'ASTB doit pénétrer dans les membranes. Pour ce faire, elle doit posséder une affinité pour les chaînes carbonées des phospholipides. Une solution serait qu'elle possède elle-même des chaînes aliphatiques venant s'insérer entre celles des phospholipides. Ces chaînes pourraient se lier aux atomes d'azote terminaux.

Les nouvelles molécules devront également rester solubles en milieu aqueux. La présence de chaînes carbonées sur la molécule réduisant également la solubilité dans l'eau, il faudra de nouveau envisager l'utilisation d'un agent de transfert de phase.

- Utilisation de groupements terminaux polaires :

Nous avons proposé d'introduire des groupements  $\text{NO}_2$  fortement donneur aux extrémités de la molécule. L'inconvénient d'une telle substitution serait une interaction avec les chaînes carbonées des lipides très répulsive, donc une insertion membranaire limitée à une pénétration jusqu'aux têtes polaires des lipides. Peut-être que l'ajout de chaînes carbonées sur un des deux atomes d'azote terminaux, et la fixation de deux atomes d'hydrogène sur le second, serait une solution. Chaque chromophore de la molécule serait sensible à un champ différent, l'un des deux serait plus sensible au champ transmembranaire. Le colorant demeurerait chiral, mais le modèle d'oscillateurs identiques couplés serait à réviser. Si un tel colorant pouvait être synthétisé, il serait pertinent de réaliser des expériences de SHG en surface pour étudier ses caractéristiques.

### **Conclusion du chapitre III :**

Notre compréhension des mécanismes à l'origine de la chiralité moléculaire a permis de proposer un modèle d'oscillateurs couplés dans le domaine non linéaire. L'ASTB en remplissant parfaitement son rôle de molécule test pour notre modèle se présente alors comme un excellent candidat pour le marquage membranaire en SHG, son activité optique provenant d'effets dipolaires électriques. Notre travail sur la spectroscopie non linéaire des molécules chirales se prolonge par une application en microscopie.

L'ASTB pouvait dès lors être considérée comme le point de départ de la synthèse de nouveaux colorants. Pour savoir quelle voie devrait être suivie pour les futures molécules nous avons étudié ses propriétés de solubilité, d'insertion membranaire, de génération de TPEF et de SHG une fois dans les membranes.

Ces études ont démontré que la forme actuelle de l'ASTB lui permettait une utilisation comme marqueur polyvalent pour l'imagerie membranaire en TPEF. Cela est dû à sa grande affinité pour les lipides, sa remarquable photostabilité, sa non toxicité et sa diffusivité importante à travers les bicouches lipidiques.

Lors de ces expériences nous n'avons pas pu détecter de signal de SHG. L'interprétation de ces résultats permet de préciser les voies d'amélioration de l'ASTB. Il est primordial d'optimiser à la fois son insertion membranaire et son efficacité de SHG. Ces deux aspects étant inéluctablement reliés, il faudra étudier simultanément ses propriétés en optique non linéaire en surface et dans des membranes modèles.

Ce travail constitue donc un protocole expérimental pour la mise au point de nouveaux colorants chiraux membranaires.



## **Chapitre IV**

### **Microscopie non linéaire basée sur des contrastes endogènes : étude et applications.**

Nous avons étudié au chapitre III, un prototype de colorant chiral pour l'imagerie de second harmonique. Nous voulons montrer dans ce chapitre que l'utilisation de la microscopie non-linéaire n'est pas forcément relié à celle de nouveaux colorants. Il est possible, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, d'imager des tissus en microscopie de TPEF ou de SHG, sans l'adjonction d'aucun composé extérieur. Le contraste est alors endogène, le signal ne provenant que de protéines naturellement présentes dans les matériaux du vivant. Nous avons choisi d'utiliser les propriétés optiques non linéaire de deux protéines du tissu conjonctif : l'élastine et le collagène. Nous avons utilisé également la myosine pour imager les cellules musculaires. Plusieurs questions se sont alors posées. Quelles sont les conditions optimales d'excitation et d'observation de l'élastine ? Le collagène possède une organisation chirale, quel est le rôle de sa chiralité dans le signal de SHG qu'il génère ?

Nous avons ensuite étudié deux problèmes de toxicologie où le contraste endogène nous apporte des informations précieuses impossibles à obtenir aussi directement par d'autres méthodes.

Dans une introduction générale (partie A) sur les contrastes endogènes, nous allons exposer les avantages de cette méthode par rapport aux techniques utilisées actuellement en histologie classique. Notre argumentation s'appuiera sur des exemples précis portant sur la peau et le tissu hépatique.

Par analogie avec le chapitre précédent, nous allons caractériser dans la partie B les sources de contraste que sont le collagène et l'élastine. Nous déterminerons alors les conditions optimales d'excitation et d'observation de l'élastine. L'importance de la chiralité du collagène dans le signal de second harmonique qu'il rayonne sera précisée.

Dans la partie C, nous démontrerons l'utilisation du contraste endogène en microscopie non linéaire pour étudier un problème concret de toxicologie. Nous montrerons les conséquences dramatiques d'un toxique : le lindane, sur l'appareil vasculaire du rat.

Enfin, dans la dernière partie, le contraste endogène de SHG sera mis à profit pour étudier un problème de toxicologie sur des cellules isolées. Nous montrerons comment la microscopie de SHG nous permet de suivre avec une grande précision l'effet de certaines toxines sur des cellules atriales de cœur de grenouille.

## IV) A. Contrastes endogènes en microscopie multiphotonique.

Dans la partie i, nous allons préciser les sources de contraste endogène identifiées à ce jour, et quels types d'échantillons elles permettent d'observer. Nous présenterons, à cette occasion, les contrastes que nous avons utilisées pour nos travaux d'imagerie. Dans la partie ii, des exemples d'images de peau et de foie seront exposées afin d'insister un nouvelle fois sur les avantages du contraste endogène en SHG et TPEF. Enfin, en iii, nous comparerons la microscopie multiphotonique avec les techniques classiques d'histologie.

### i. Sources de contraste

L'utilisation de contrastes endogènes en microscopie multiphotonique permet d'imager des structures en profondeur sans l'introduction d'aucun colorant extérieur, donc d'aucun élément perturbateur. Il est possible d'imager des coupes d'artère carotide d'une épaisseur de l'ordre de 400 µm (cf. IV)C). Ceci fournit des informations sur la construction et l'organisation des tissus dans leur ensemble. A partir de ces informations, il est possible d'essayer de lier certaines déformations observées à certaines pathologies. La microscopie non linéaire permet ainsi d'obtenir des informations morphologiques et (ou) structurales détaillées sur les cellules et les tissus. La mesure de contracture de cellules musculaires, par exemple, nous donne accès à une meilleure compréhension du fonctionnement cellulaire. Il est ainsi possible de réaliser de l'imagerie fonctionnelle.

La microscopie TPEF de chromophores endogènes peut, par exemple, servir de diagnostic pour différencier les tissus sains des tissus dysplasiques et néoplasiques en cancérologie, la fluorescence étant différente suivant le tissu [*Richards-Kortum, 1996*].

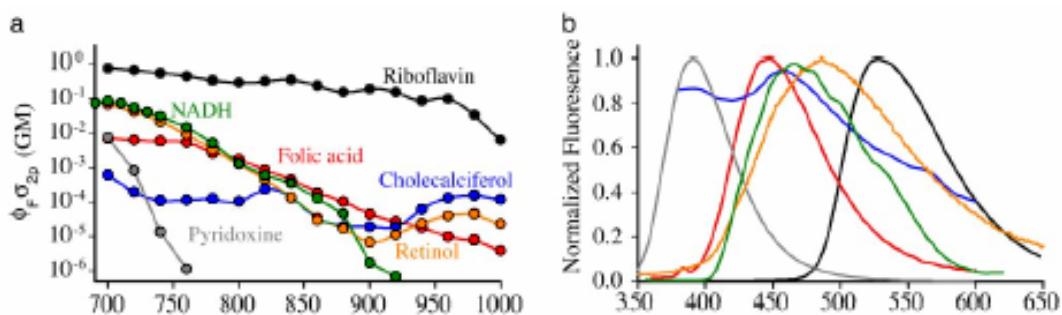
Il peut être utile, dans d'autres cas, de relier les modifications spectroscopiques de l'émission à certaines pathologies. Certaines études, sur la maladie d'Alzheimer, suivent le spectre d'émission des indoléamines qui varient suivant leur état de polymérisation, les polymères étant impliqués dans la neurodégénérescence [*Wrona, 1998*], [*Zipfel, 2003*]. Cette démarche permet de rendre encore plus spécifique l'imagerie utilisant des agents de contraste endogène.

L'utilisation des propriétés optiques endogènes des tissus ne peut se faire de façon rigoureuse qu'à la condition d'avoir caractérisé les sources de contraste utilisées.

Plusieurs sources de contraste endogène en SHG ou TPEF ont été identifiées aussi bien dans les cellules que dans le tissu conjonctif. La plupart des chromophores naturels sont des dérivés d'acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine (émission dans l'UV) ou des dérivés de vitamines (B3, B6, dérivant de la pyridine : cycle comportant 5 atomes de carbone et un atome d'azote) qui peuvent émettre entre 400 et 600nm [Deyl, 1980]. Nous précisons dans la partie suivante les sources de contraste en imagerie cellulaire.

- Sources de contraste dans les cellules :

Dans les cellules, il est possible d'exciter la fluorescence de façon non linéaire de plusieurs constituants comme le NAD(P)H (nicotinamide protonée adénine dinucléotide phosphate, dont le cycle nicotinamide dérive de la vitamine B3) sous forme réduite [Piston, 1994], [Huang, 2002], [Campagnola, 2002], les flavines, le rétinol, le tryptophane [Maiti, 1997] (acide aminé aromatique) et ses dérivées indoléamines comme la sérotonine et la mélatonine [Zipfel, 2003]. Leur spectre d'émission de fluorescence est identique à celui en régime linéaire [Richards-Kortum, 1996]. Les sections efficaces de TPEF et les spectres d'émission des composés présents dans les cellules, utilisables comme sources de contraste endogène, sont exposées à la figure IV)A.1. D'après la figure IV)A.1.a, les chromophores qui possèdent des spectres d'excitation disjoints sont excitables sélectivement. Par exemple, le NADH est excitable en dessous de 700nm alors qu'il est possible d'exciter la riboflavine sur tout le spectre d'un oscillateur Ti : Saphir même au-delà de 950nm. Il est également possible, pour une même longueur d'excitation, de détecter séparément le signal de fluorescence de la vitamine D, qui émet à partir de 350nm, du signal émis par le rétinol centré vers 500nm. En ce qui concerne la SHG, une source de contraste dans les cellules musculaires est localisée au niveau du complexe acto-myosine, [Campagnola, 2002], [Both, 2003].



**Figure IV)A.1 :** a : section efficace de TPEF de composés utilisés en contraste endogène, b : spectre d'émission de fluorescence. Mesures effectuées dans l'éthanol pour le rétinol et la vitamine D (cholécalciférol), dans une solution saline à pH=7,2 pour les autres. Mesures provenant de : [Zipfel, 2003].

- Sources de contraste du tissu conjonctif :

Dans la matrice extracellulaire, il existe deux sources principales de contraste endogène qui sont deux protéines : l'élastine (structurée en fibrilles ou en feuillets, source de TPEF) et les collagènes fibrillaires (type I, type II et le mélange des types I et III, sources de SHG) [Zoumi, 2002], [Campagnola, 2002]. Freund a imaginé un tendon de rat dès 1986 avec une résolution de 50 µm grâce au signal de SHG émis par le collagène fibrillaire présent dans cette structure, [Freund, 1986]. Collagène et élastine ont permis d'imager différents types de tissus notamment : des coupes d'artéries (collagène I et III et élastine), du cartilage (collagène II), des os (collagène I), de nombreux organes comme le poumon (collagène I), la peau (collagène I et III et élastine), le foie (rétilinol, NAD(P)H et collagène) [Zipfel, 2003].

Ce sont ces deux protéines qui retiennent notre attention pour ce travail expérimental concernant le tissu conjonctif. Ces macromolécules produisent des signaux bien distincts. Pour une excitation commune, l'élastine émet un signal de façon isotrope (TPEF), alors que les fibres de collagène émettent un signal de SHG essentiellement copropagatif. Ce signal de SHG est d'autant plus intense que l'état de polarisation de la lumière incidente est dans l'axe des fibres [Zipfel, 2003]. Lors d'une excitation à 860 nm, les fibres de collagène fourniront un signal de SHG à 430nm émis principalement vers l'avant, alors que l'on détectera le signal de TPEF émis par l'élastine de façon isotrope au-delà de 450 nm. Nous voyons, dès lors, que le microscope présenté dans la partie C du chapitre II est particulièrement adapté pour l'imagerie simultanée de l'élastine (signal rétro collecté, filtré à travers un filtre passe haut au-delà de 450 nm) et du collagène (signal transmis et sélectionné par un filtre interférentiel à 430nm). Il est cependant possible de détecter le signal de SHG émis par le collagène en rétro collection [Guo, 1997].

Le tableau IV)A.1 présente une liste de composés identifiés comme sources de contraste endogène pour la microscopie non linéaire (TPEF, SHG ou fluorescence excitée à trois photons), il présente pour certains d'entre eux les sections efficaces de fluorescence à un ou deux photons [Zipfel, 2003].

Molecule	Process	$\lambda_{ex}$ 50% max, nm*	Cross section
Tyrosine	3PE	<700	$1 \times 10^{-84}$
Tryptophan	3PE	700-740	$1 \times 10^{-84}$
Serotonin	3PE	700-720	$4 \times 10^{-84}$
Melatonin	3PE	700-720	$7 \times 10^{-84}$
5-HIAA	3PE	700-720	$2 \times 10^{-84}$
5-HTOL	3PE	700-720	$5 \times 10^{-84}$
Retinol	2PE	700-830	$7 \times 10^{-52}$
Flavins	2PE	700-730	$1-8 \times 10^{-51}$
NADH	2PE	690-730	$9 \times 10^{-52}$
Pyridoxine	2PE	690-710	$8 \times 10^{-53}$
Folic acid	2PE	700-770	$7 \times 10^{-53}$
Cholecalciferol	2PE	<700	$6 \times 10^{-54}$
Elastin	2PE	700-740	—
NFTs	2PE	700-780	—
Lipofuscin	2PE	700-850	High <sup>f</sup>
Collagen	SHG	700-740	—
Microtubules	SHG	—	—
Skel. muscle	SHG	—	—

**Tableau IV)A.1 :** d'après Zipfel (PNAS 2003 100: 7075-7080) liste de constituants naturels des tissus fournissant un contraste endogène en SHG, 2PE(=TPEF) ou 3PE(absorption simultanée de 3 photons), les sections efficaces sont exprimées en  $\text{cm}^4\text{s}$  (2PE) et en  $\text{cm}^6\text{s}$  (3PE),  $\lambda_{ex}$  désigne la plage de longueur d'onde d'excitation accessible à un laser Ti : saphir pour laquelle la section efficace vaut 50% de sa valeur maximale.

L'imagerie simultanée du collagène et de l'élastine s'avère être une méthode de choix pour observer les tissus qui contiennent ces deux protéines (peau et vaisseaux par exemple). L'utilisation des propriétés optiques endogènes est particulièrement adaptée car il n'existe que très peu de colorants marquant spécifiquement l'élastine sans marquer également le collagène. La spécificité de la SHG collagénique, associée à l'imagerie TPEF de l'élastine, permet donc de recueillir de nombreuses informations sur la structure des tissus, comme nous allons le voir par la suite.

Nous allons présenter deux exemples de tissus imagés en microscopie SHG/TPEF, celui de la peau et du foie. Ils vont nous permettre d'asseoir notre argumentation sur les contrastes endogènes en présentant un grand nombre de structures qu'ils permettent d'identifier.

## ii. Exemples

Le collagène fibrillaire et l'élastine sont des agents de contraste naturels pour la microscopie de second harmonique et de fluorescence excitée à deux photons. Ces protéines sont omniprésentes dans l'organisme. Elles entrent dans la constitution de la peau et de tout le tissu conjonctif. Le collagène intervient dans la constitution des os. L'élastine peut être impliquée dans de nombreuses pathologies comme le syndrome de Marfan (maladie héréditaire du tissu conjonctif correspondant à une anomalie de la fibrilline, 1 cas sur 5000) [Le Parc, 2003]. Des modifications du collagène et de l'élastine ont lieu lors du vieillissement des individus [Gallop, 1975], [Robert, 1989].

Nous allons présenter ici deux séries d'images SHG/TPEF afin d'illustrer les caractéristiques de la microscopie multiphotonique.

Nous avons tout d'abord réalisé des images de la peau. Nous présenterons les différentes structures que la microscopie non linéaire permet d'identifier.

Ensuite nous avons réalisé des images du tissu hépatique. Ces observations de foie peuvent conduire à une estimation de l'avancée d'une pathologie comme la cirrhose.

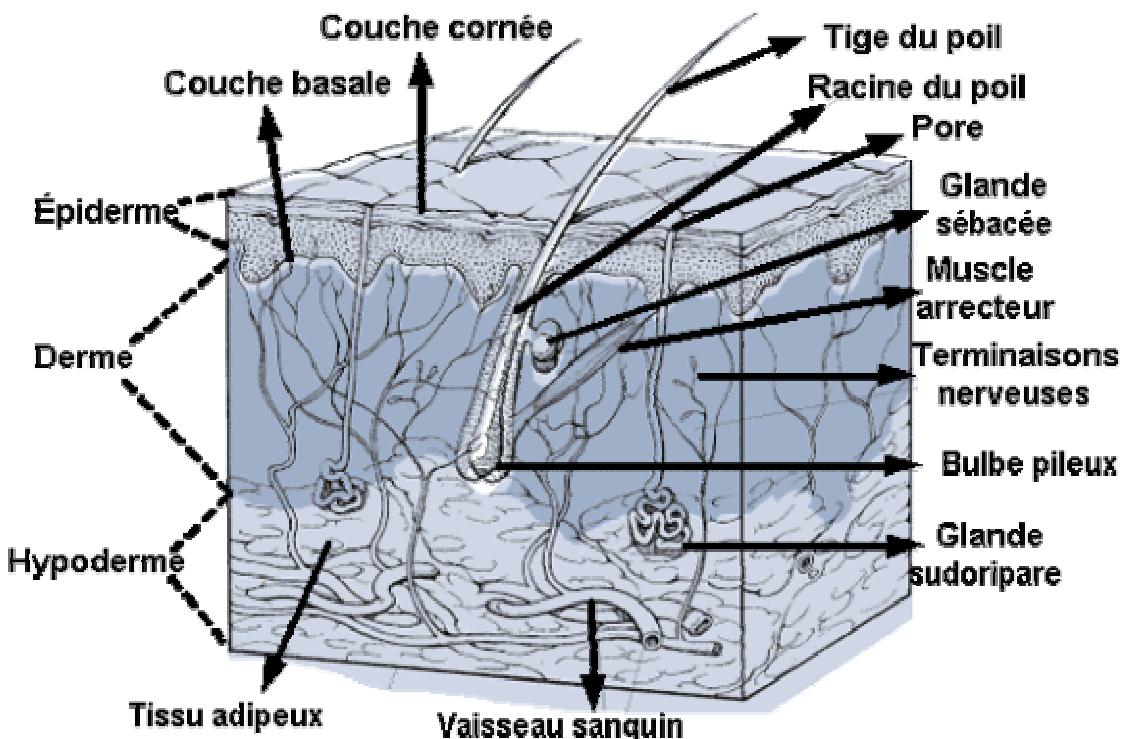
- Constitution de la peau :

La peau est constituée de deux couches empilées (figure IV)A.2) [Civatte, 1982]. La première : l'épiderme en contact avec l'extérieur, comporte un tissu épithélial dont les cellules peuvent durcir en se kératinisant ; la seconde : le derme formé par un tissu conjonctif lâche et dense. Ces deux parties sont reliées l'une à l'autre. En dessous de la peau se situe l'hypoderme également appelé tissu sous-cutané constitué majoritairement de tissus graisseux. Des faisceaux collagéniques s'étendent du derme au tissu sous cutané assurant à cet empilement sa stabilité.

L'épiderme est constitué de 4 à 5 couches de cellules (strates) selon la région du corps. La couche la plus profonde, la membrane basale, est particulièrement active. Les cellules de cette strate se divisent très rapidement pour pallier à la mort des cellules en surface. Nous renouvelons ainsi entièrement notre épiderme tous les 25 à 50 jours. Il n'y a pas de vaisseaux sanguins dans l'épiderme. Il y a plusieurs types de cellules (kératynocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans,) ayant des fonctions différentes dans l'épiderme (figure IV)A.2).

Le derme est en moyenne quatre fois plus épais que l'épiderme, sa taille varie en fonction de la zone du corps. Il comporte une quantité importante de collagène pour assurer son soutien. L'élastine est également présente pour conférer au tissu son élasticité. Ces fibres élastiques se raréfient avec l'âge. On décompose le derme en deux zones :

- ◆ La zone papillaire placée en dessous de la lame basale.
- ◆ La zone réticulaire, la plus profonde, qui contient de nombreux vaisseaux sanguins, des glandes sudoripares et sébacées, et de nombreuses cellules phagocytaires protégeant d'intrusions bactériennes. Le collagène et l'élastine y sont présents.



**Figure IV)A.2 :** coupe schématique de la peau.(Atlas anatomique AMA).

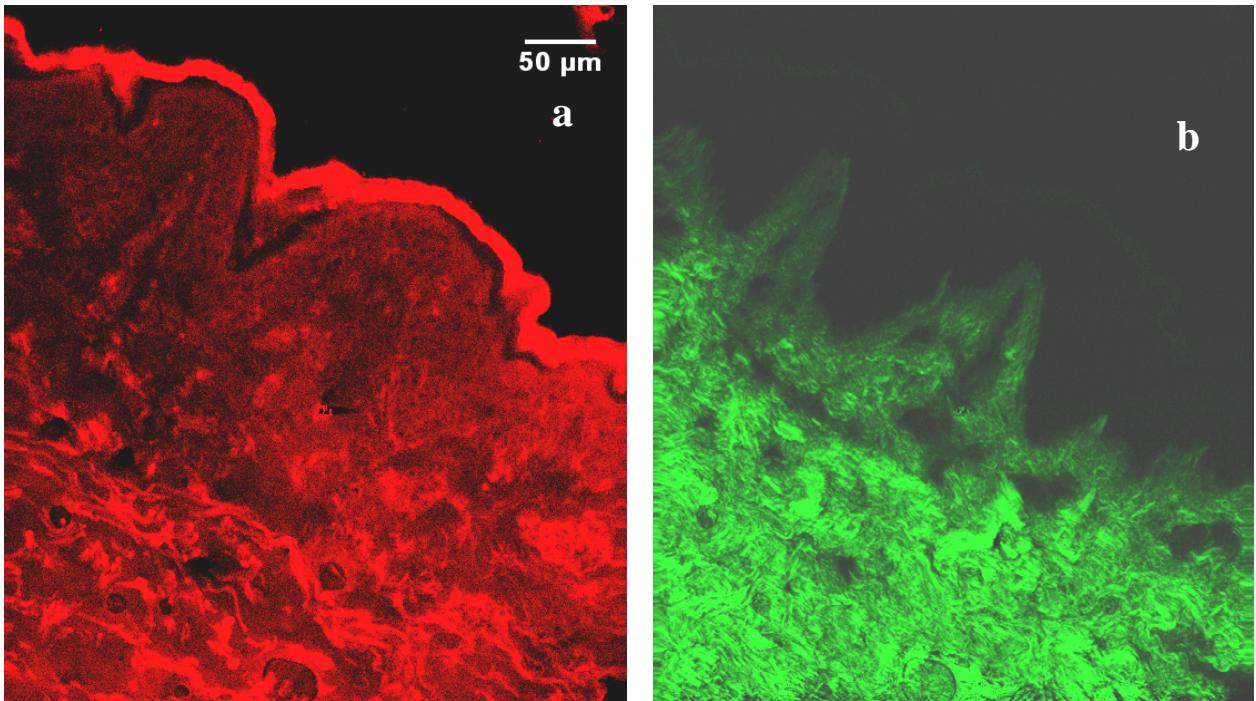
- Observations :

Echantillons : Des coupes histologiques de peau humaine prélevées sur l'avant-bras étaient à notre disposition (Pr. Godeau, Université Paris V, Montrouge), elle mesuraient 10µm d'épaisseur et n'étaient pas colorées. Elles sont découpées perpendiculairement à la surface de la peau. Le prélèvement était issu d'une personne ne présentant aucune pathologie dermatologique. La coupe était incluse entre une lame et une lamelle.

Nous avons utilisé un objectif 20X d'ouverture 0.95 à immersion à eau fournissent à la fois un large champ de vue et une résolution importante.

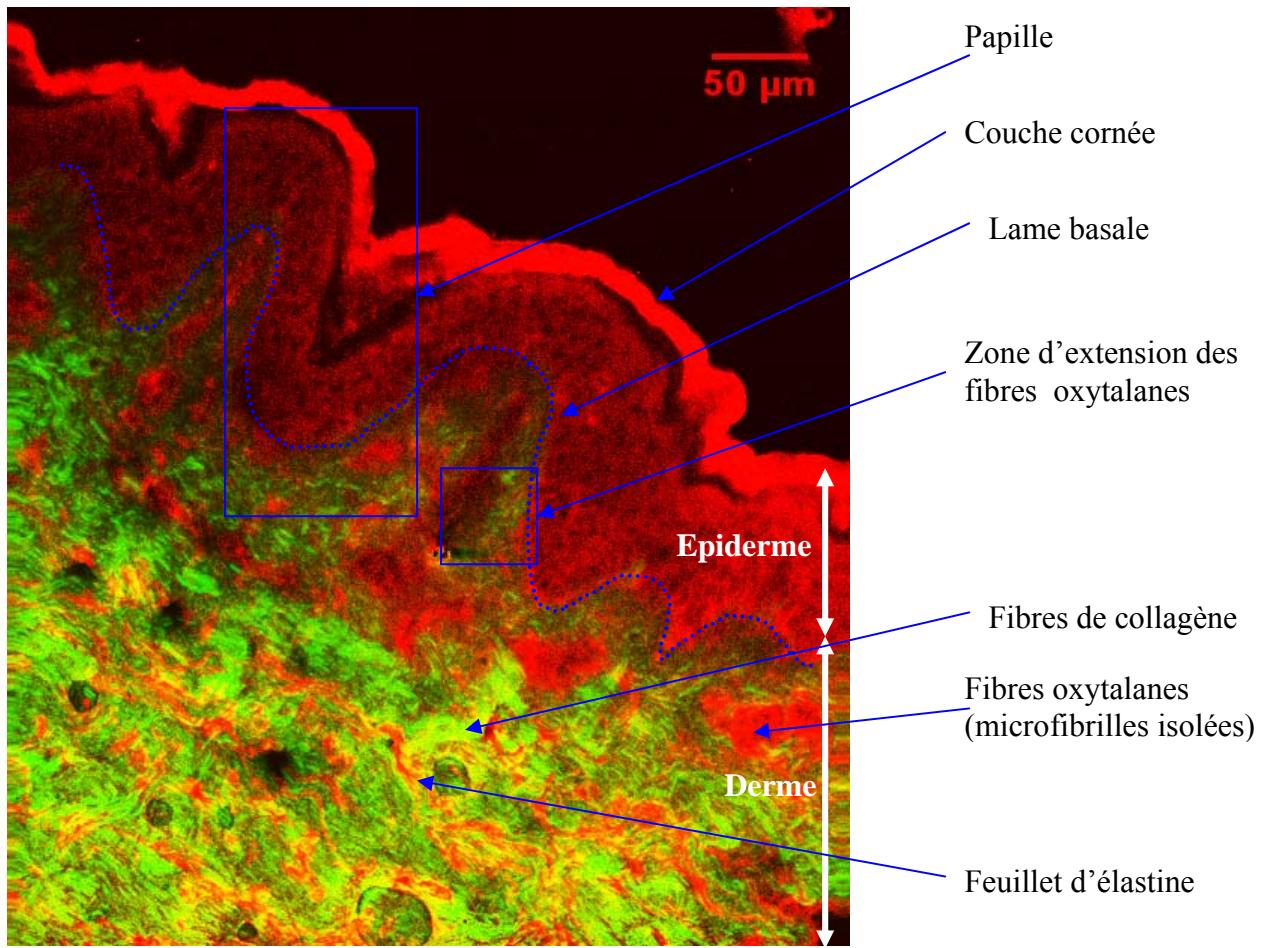
La lumière incidente issue de l'oscillateur Ti : Saphir est réglée à 900nm avec une puissance moyenne incidente au foyer de 15mW. Le signal de fluorescence est détecté à travers 2 filtres E700sp et un filtre GG475 vers l'arrière, celui de SHG traverse deux filtres E700sp et un filtre passe bande à 450nm (Chroma transmission : 80%, largeur 20nm).

Nous allons pouvoir identifier le derme de l'épiderme, le collagène(I) émetteur de SHG n'étant présent que dans la zone la plus profonde, c'est-à-dire le derme (Figure IV)A.3.b).



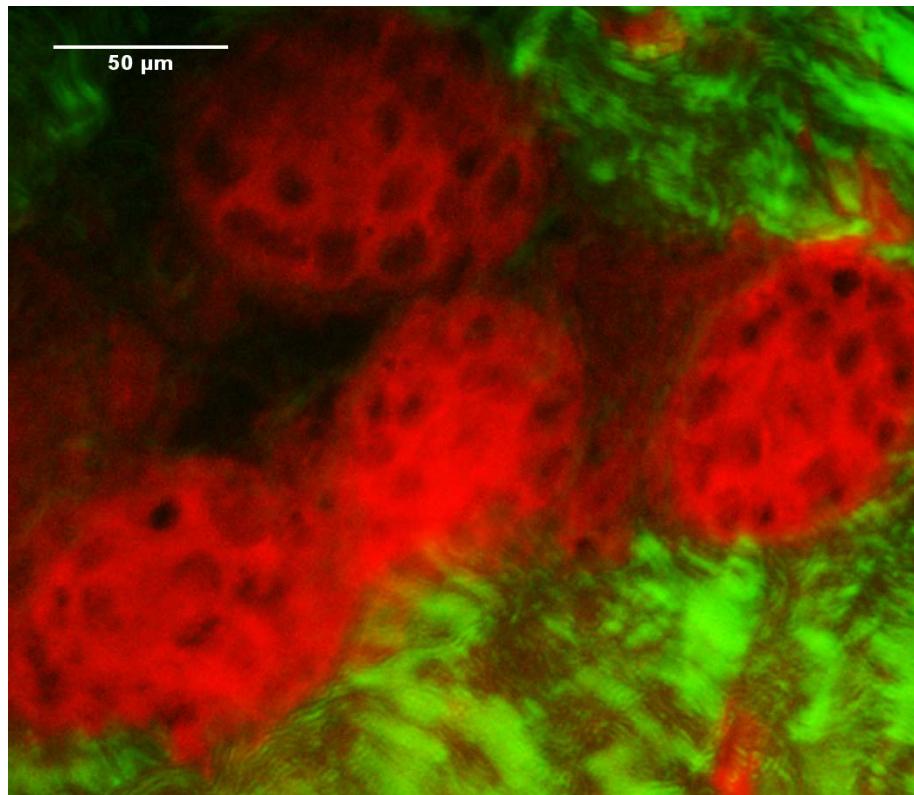
**Figure IV)A.3.** *a* : image TPEF d'une coupe de peau, filtre GG475. *b* : SHG collagène filtre HQ450/50. Objectif 20X Olympus à eau O.N. : 0.95, excitation 900nm 15mW. Temps par pixel : 10μs.

On observe la couche cornée très fluorescente. Ceci est dû, *a priori*, à la présence de kératine. Sur la figure IV)A.3.a, la lame basale où des zones plus claires correspondent aux fines fibres oxytalanes (reliant la lame basale à la première couche du derme où l'on trouve des fibres d'élaunine, elles sont constituées d'élastine fibrillaire et s'orientent parallèlement à la liaison dermo-épidermique où naissent les microfibrilles). On distingue très nettement la lame basale séparant le derme de l'épiderme. Elle contient notamment du collagène IV, qui ne fournit aucun signal de SHG ou de TPEF. On reconnaît les zones papillaires correspondant aux renflements présents. Les lignes très lumineuses fluorescentes dans les couches profondes du derme correspondent aux fibres élastiques.



**Figure IV)A.4 :** superposition de l'image IV)B.3.a de fluorescence et de l'image IV)B.3.b de SHG

Nous avons également étudié d'autres coupes qui présentaient des glandes sudoripares. Pour observer ces glandes, nous utilisons un objectif 60X à immersion à eau d'ouverture 0.9, avec un rayonnement incident à 860nm de 20mW. Nous utilisons un filtre GG3 pour détecter la fluorescence rétrocollectée (associé à des filtres E700sp) et un filtre interférentiel Chroma HQ430/20 pour le signal harmonique transmis (utilisation de filtres E700sp). Le résultat de la superposition des deux images est présenté sur la figure IV)A.5.



**Figure IV)A.5 :** image de glandes sudoripares. Image TPEF (rouge) filtre GG3. Image SHG (vert) venant du collagène filtre HQ430/20. Objectif 60X Olympus à eau O.N. : 0.9, excitation 860nm 20mW. Temps par pixel : 10μs.

Ces observations effectuées sur des coupes histologiques auraient pu être réalisées sur des prélèvements de peau épais. La fixation du tissu ainsi que sa découpe au microtome n'est alors plus nécessaire. Il existe donc un gain de temps et de manipulation important en utilisant conjointement la microscopie de fluorescence à deux photons et celle de SHG. Cette réunion permet d'observer la peau immédiatement après rasage et prélèvement en évitant également les étapes de fixation et de coloration nécessaires en microscopie classique. L'observation de la peau et la détection d'anomalies sont également facilitées par la reconstruction dans l'espace des images obtenues dans différents plans.

La microscopie multiphotonique se révèle donc être un outil particulièrement bien adapté pour les études histologiques effectuées sur la peau. Les nouveaux contrastes permettent d'identifier un grand nombre de structures connues (derme, épiderme, lame basale, feuillets d'élastine, collagène, glande sudoripare, etc..), avec une représentation assez proche de la vision classique.

- Cirrhose du foie :

La cirrhose hépatique est le cas le plus avancé de la fibrose. Lors d'une fibrose, l'organe cible (foie ou parenchyme pulmonaire) est envahi par des fibres de collagène. Ceci est accompagné d'une nécrose des hépatocytes. Une distorsion vasculaire en résulte ainsi qu'une régénération nodulaire des hépatocytes.

La cirrhose peut être causée par une hépatite C ou B, un alcoolisme, une déficience d' $\alpha$ 1-antitripsine (la production d'antitripsine venant du foie est anormale, la tripsine dégrade alors les tissus), une hémochromatose (accumulation de fer), et une tyrosinémie (insuffisance d'hépatocytes d'origine génétique, problème de production de la phénylalanine) [Poynard, 1997].

- Prélèvement :

L'observation routinière de foie se fait par prélèvement d'une carotte d'un centimètre de long et de quelques millimètres d'épaisseur.

Dans le cas d'une observation en microscopie multiphotonique, seule une découpe de la biopsie en section d'un millimètre d'épaisseur est requise. Le gain de temps est considérable et les risques liés aux différentes étapes du mode opératoire sont réduits.

- Observations :

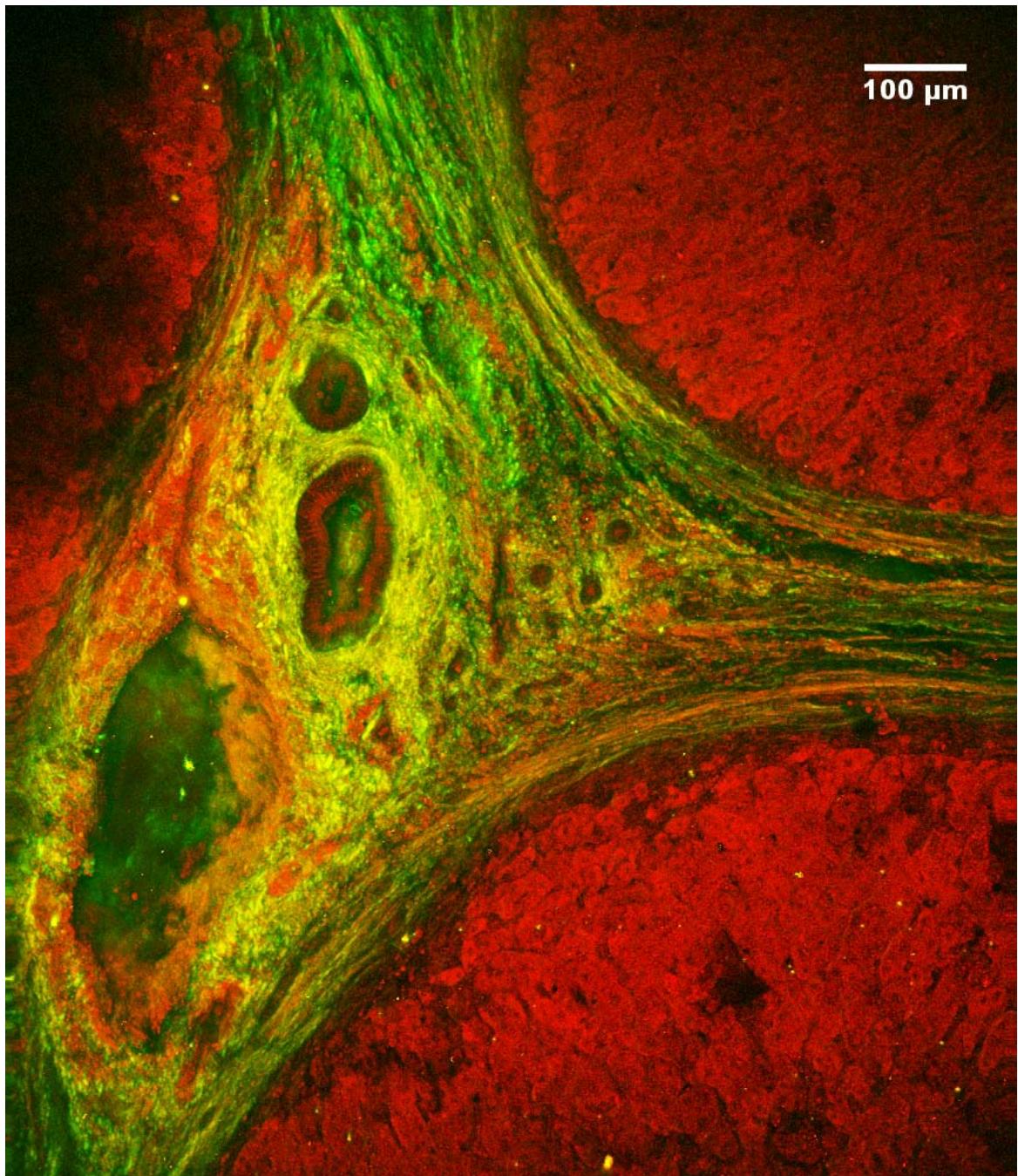
Des biopsies de foie fixées dans le formol non colorées ont été utilisées, des tranches d'un millimètre d'épaisseur sont découpées et placées dans une solution physiologique. Nous avons utilisé un objectif Zeiss Neofluar 10X à air permettant un champ de vue important (2mm). Il possède une ouverture de 0.3 permettant ainsi une résolution latérale de 1,2 $\mu$ m. Cet objectif a été choisi en fonction de son champ de vue, car les faisceaux de collagène s'étendent sur plusieurs millimètres.

La lumière incidente issue de l'oscillateur Ti :Saphir est réglée à 860 nm, avec une puissance moyenne incidente au foyer de 15 mW, permettant de se placer dans une zone spectrale où le signal de fluorescence et celui de SHG sont importants. Une pénétration importante dans le tissu est possible (jusqu'à 400  $\mu$ m dans le foie étudié avec l'objectif précisé à 15 mW).

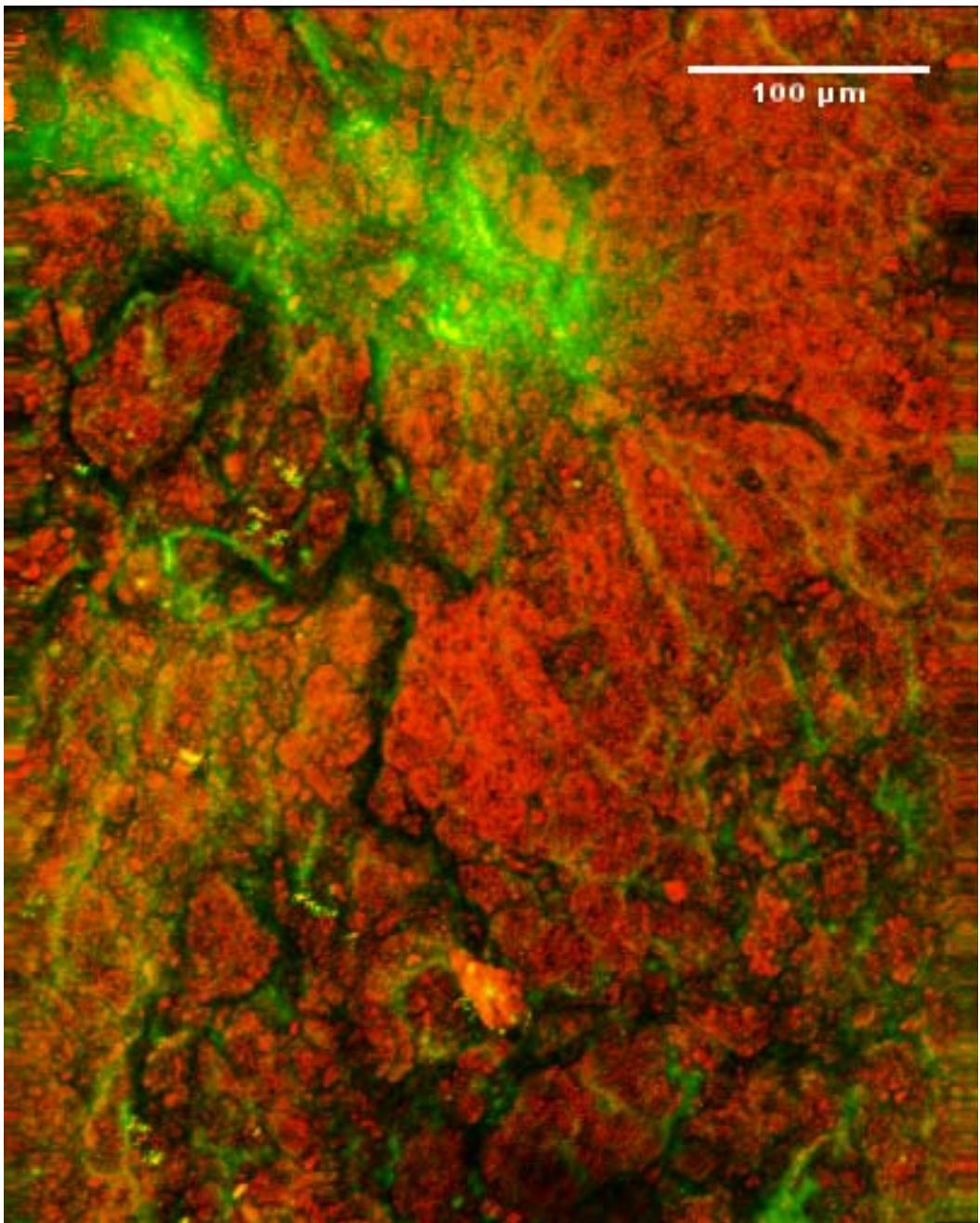
Le signal de fluorescence est détecté à travers 2 filtres E700sp et un filtre GG3 vers l'arrière, celui de SHG traverse deux filtres E700sp et un filtre interférentiel à 430 nm (Chroma HQ430/20) vers l'avant.

Nous identifions le collagène présent naturellement autour des vaisseaux car c'est l'émetteur de SHG présent dans le tissu (figure IV)A.6 et 7). En partant des vaisseaux, le collagène remplace les zones saines contenant des hépatocytes, il relie les vaisseaux entre eux isolant ainsi les hépatocytes (fluorescents) en nodules. Ces nodules sont absents du foie sain observé.

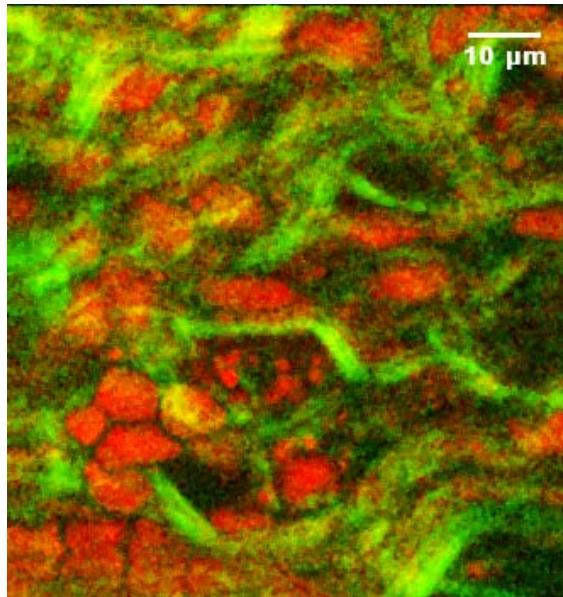
Nous avons utilisé un objectif Olympus Plan-Fluorite 60X à immersion à eau, d'ouverture 0.9, avec les mêmes filtres, pour visualiser la structure du foie sain. On observe les cellules tenues entre elles par le tissu conjonctif où des fibres de collagéniques sont visibles (figure IV)A.8).



**Figure IV)A.6 :** Image de foie cirrhotique. Les fibres de collagène relient les vaisseaux entre eux ce qui entraîne l'apparition de nodules. Image TPEF (rouge) filtre GG3. Image SHG (vert) provenant du collagène filtre HQ430/20. Objectif 10X à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 20mW. Temps par pixel : 10μs. Projection de 80 images espacées de 3μm (épaisseur : 240μm), intensité moyenne.



**Figure IV)A.7 :** Image de foie cirrhotique. Les fibres de collagène relient les vaisseaux entre eux ce qui entraîne l'apparition de nodules. Image TPEF (rouge) filtre GG3. Image SHG (vert) provenant du collagène filtre HQ430/20. Objectif 10X à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 20mW. Temps par pixel : 10μs. Projection de 40 images espacées de 3μm (épaisseur : 120μm), intensité moyenne.



**Figure IV)A.8 :** Image de foie sain. Les hépatocytes (fluorescents en rouge) sont entourés par le tissu conjonctif comportant des fibres de collagène (en vert). Objectif 60X à air O.N. : 0.9, excitation 860nm 20mW. Taux par pixel : 100kHz. (Filtres identiques à fig.IV)A.7)

Ces images, comme les techniques microscopiques classiques, permettent d'évaluer la quantité de tissu sain remplacé par du collagène. Elles devraient ainsi permettre une classification dans l'avancée de la fibrose. Une classification existe déjà et classe l'avancée de la maladie sur une échelle de 4 niveaux. Un étalonnage serait requis pour faire correspondre l'appréciation entre la microscopie classique sur coupes fines et l'imagerie non linéaire sur coupes épaisses.

Malgré un coût important, surtout dû à la source laser, la microscopie non linéaire apparaît donc comme une technique de choix pour l'histologie. Elle permet une reconnaissance directe des structures à partir de compétences acquises en microscopie classique avec colorants. Il est donc approprié d'envisager un transfert de compétences histologiques à la microscopie multiphotonique.

A la lumière de ces deux exemples, nous pouvons développer notre argumentation démontrant les avantages de la microscopie non linéaire par rapport aux méthodes traditionnelles en histologie.

### iii. Comparaison avec l'histologie classique

Cette partie discute en quoi la microscopie non linéaire en contraste endogène est une alternative viable à l'histologie classique. Nous rappelons d'abord une méthode usuelle de fabrication d'une coupe tomographique déposée sur une lame de microscope à partir d'un prélèvement (nous n'exposerons pas la méthode par congélation utilisée en parallèle des actes chirurgicaux).

1. *Le prélèvement frais est plongé dans le formol (formaldéhyde) pour assurer sa conservation (quelques heures).*
2. *Paraffinage de l'échantillon avant découpe au microtome. Lavage à l'alcool, puis exposition au xylène et enfin à la paraffine (la paraffine étant soluble dans le xylène mais pas dans l'eau). Durée : une nuit.*
3. *Découpe au microtome. Epaisseur variable entre 3 et 20µm. Au-delà de 30µm la coupe s'étalera difficilement sur la lame. Les coupes sélectionnées pour leur représentativité du prélèvement sont plongées dans un mélange eau-albumine afin qu'elles puissent adhérer sur la lame. Durée : 5 à 10minutes par lame. Une autre méthode utilisant de la gélatine est possible. Les lames sont préalablement plongées dans une solution de gélatine liquide chaude, qui assurera les liaisons avec la coupe. Les lames doivent alors être placées à l'étuve durant 20minutes.*
4. *Etape de coloration. On déparaffine les lames (xylène puis alcool puis eau) et on met en présence du colorant. Durée : 1 heure.*
5. *Collage de la lamelle à l'aide d'une résine acrylique solubilisée dans le xylène grâce à un automate, puis séchage. Durée : 2 heures.*

La technique employée pour l'observation en SHG et TPEF de section d'artère carotide ou d'aorte, par exemple, est beaucoup plus simple puisqu'elle ne comporte qu'une seule étape. On dépose le tissu vivant dans une solution physiologique (de Tyrode) dans une boîte de Pétri qui permettra une observation directe au microscope. Les échantillons trop épais sont découpés en morceau d'un millimètre d'épaisseur.

- Avantages de la microscopie non linéaire :

Par rapport au temps nécessaire pour préparer une lame, la microscopie non linéaire permet un gain de temps considérable entre 20 et 30 heures suivant la taille des pièces et le nombre de coupes à réaliser.

Le temps de préparation d'une lame étant très long, il faut procéder à une sélection des coupes pertinentes pour l'anatomopathologiste. Cette sélection est une source d'erreurs. En microscopie non linéaire, on peut imager à différentes profondeurs l'échantillon avec un espacement entre les plans qui peut atteindre 500 nm (à adapter en fonction de la résolution axiale de l'objectif). Suivant la résolution désirée, l'image d'un plan demande un temps d'acquisition compris entre 2s et 2minutes. Le temps pour acquérir une pile d'images n'est donc pas un facteur limitant. Il n'y a ainsi aucune perte d'informations sur la structure du tissu à imager.

Aucune interaction entre le prélèvement et des produits actifs n'est possible dans notre approche, alors qu'elles sont nombreuses en histologie classique (interaction avec le formaldéhyde, la paraffine, le xylène et la résine acrylique). Les modifications engendrées perturbent les propriétés spectroscopiques des différents composés des tissus. Cette différence est essentielle. En microscopie non linéaire, il est possible de travailler avec du tissu vivant, alors que c'est impossible avec une coupe histologique. Des informations sur le fonctionnement du tissu peuvent alors être recueillies, il s'agit d'un avantage considérable. Il est même envisageable de réaliser des expériences de pharmacologie dynamique en SHG.

Un autre aspect essentiel est que plus il y a d'étapes, plus il y a de perturbations possibles de l'intégrité de l'échantillon. Un exemple essentiel est celui de la découpe au microtome. Le sectionnement de fibres de collagène est très délicat en raison de leur résistance considérable. Lors de la découpe il y a de nombreux accidents de coupes et des contraintes mécaniques qui peuvent perturber profondément l'organisation des tissus. Lors du premier prélèvement, ces perturbations sont présentes dans les régions superficielles de l'échantillon, mais en microscopie non linéaire nous avons la possibilité de nous placer loin de ces régions (typiquement une centaine de micromètres), où nous serons alors moins gênés par les déformations introduites.

Un autre avantage de la microscopie TPEF et SHG est qu'elle fournit au Médecin une information similaire à celle dont il a l'habitude avec des colorants spécifiques du collagène

ou de l'élastine. Il pourra ainsi être efficace rapidement en travaillant avec ces nouvelles images issues de ces nouveaux contrastes, les critères de diagnostic demeurant inchangés.

La technique que nous avons présentée ne comporte pas que des avantages, elle possède également quelques inconvénients qui ne sont malgré tout pas rédhibitoires.

- Inconvénients de cette approche :

Dans la proposition d'une nouvelle technique, l'aspect financier est essentiel. L'utilisation d'un système laser femtoseconde et d'un microscope à balayage est certes un investissement considérable, mais il faut le comparer au temps de travail des techniciens et des médecins dans la préparation des coupes histologiques. La réduction des coûts et la simplification d'utilisation des chaînes laser plaideront de plus en plus en la faveur de l'imagerie multiphotonique.

Malgré la possibilité d'imager en particulier les structures collagéniques et élastiques, la spécificité de l'imagerie non linéaire endogène ne permet pas d'observer n'importe quelle protéine comme l'immuno marquage. Nous sommes ainsi limités à un nombre restreint de structures observables.

Après avoir montré l'intérêt de l'imagerie non linéaire en histologie, nous allons étudier, dans la partie suivante, plus précisément les sources de contraste endogène que sont l'élastine et le collagène.

## IV) B. Propriétés de fluorescence à deux photons de l'élastine et de SHG du collagène

Ce paragraphe est composé de deux parties. Tout d'abord, nous décrirons la constitution de l'élastine (source de fluorescence), ainsi que ses propriétés de TPEF. Dans une seconde partie, nous étudierons les propriétés du collagène (source de SHG). Nous exposerons la façon dont il est constitué, et nous estimerons à partir d'expériences de SHG en surface quelle est l'importance de la chiralité de cette protéine pour la génération de second harmonique. Il sera également possible d'identifier le type de chiralité impliquée.

### i. Elastine

- Contexte Biologique :

L'élastine est présente dans le tissu conjonctif (entourant les cellules) et lui confère son élasticité. C'est la protéine ( $\sim 70\text{kDa}$ ) la plus résistante de l'organisme, elle n'est pas dénaturée après l'action d'une solution de soude à  $0,1\text{mol/L}$  portée à ébullition durant 45 minutes. Cette méthode permet d'ailleurs d'extraire l'élastine de la matrice extracellulaire.

L'élastine provient d'un assemblage de deux précurseurs de tropoélastine (800 résidus). Ils sont synthétisés dans les fibroblastes (présents dans le cartilage, les cellules de muscle lisse présentes dans la paroi vasculaire, le derme). La tropoélastine est soluble en milieu aqueux, à la différence de l'élastine qui est insoluble. La tropoélastine possède une composition d'acides aminés à peu près identique à celle de l'élastine avec toute fois une plus forte proportion en résidus lysine. Sous l'action d'un enzyme, la lysyl-oxydase (cofacteurs : cuivre et pyridoxal phosphate), certains résidus lysine de la tropoélastine vont subir une désamination oxydative et des condensations successives. Ceci permet la formation de desmosine et isodesmosine qui permettent de relier deux chaînes polypeptidiques de tropoélastine entre elles (4 à 5 moitiés de (iso)desmosine par chaîne). La structure de l'élastine est donc un assemblage en réseau

covalent tridimensionnel. La cellule produit également des glycoprotéines de structure microfibrillaires comme la fibrilline, qui interviennent dans la composition des fibres élastiques. L'élastine peut s'organiser en feuillets comme dans le cas des vaisseaux. [Keeley, 2004], [Hornebek, 1987], [Sandberg, 1977].

La structure de l'élastine (Figure IV)B.1) montre une proportion importante de résidus apolaires (60% : glycine, proline, alanine, valine, phénylalanine, isoleucine, leucine) et une faible proportion de résidus polaires (30%) tels que l'aspartate, le glutamate, la lysine et l'arginine[Cleary, 1996].

Il existe deux régions aux propriétés mécaniques différentes dans l'élastine. Une première région est extensible et hydrophobe (présence de coudes  $\beta$ ), une seconde est rigide (riche en alanine et lysine). C'est dans la seconde région rigide que se font les liaisons entre filaments.

Le réseau d'élastine emprisonne en son sein des fibres de collagènes (voir figure IV)C.12).

Dans les vaisseaux ou la peau, l'élastine peut s'organiser en feuillets entre lesquels se place des cellules de muscle lisse assurant la déformation des tissus.

Certaines pathologies, comme l'hypertension ou l'athérosclérose (perte d'élasticité des coudes  $\beta$  par fixation de calcium et de lipides ou plaques d'athéromes), sont associées à l'élastine [Robert, 1980]. Dans le cas du vieillissement, la taille des feuillets est réduite, ce qui engendre également une perte d'élasticité [Robert, 1989]. Nous verrons un exemple détaillé concernant l'effet d'un toxique, le lindane, dans la partie C de ce chapitre.

L'élastine n'est pas visible en microscopie en transmission en l'absence de colorants (catéchine fuschine, hématoxyline de Verhoeff, orcéine). Par contre, elle est observable directement en microscopie non linéaire par fluorescence à deux photons. Il s'agit donc de caractériser ses propriétés afin de l'utiliser de façon optimale comme agent de contraste endogène.

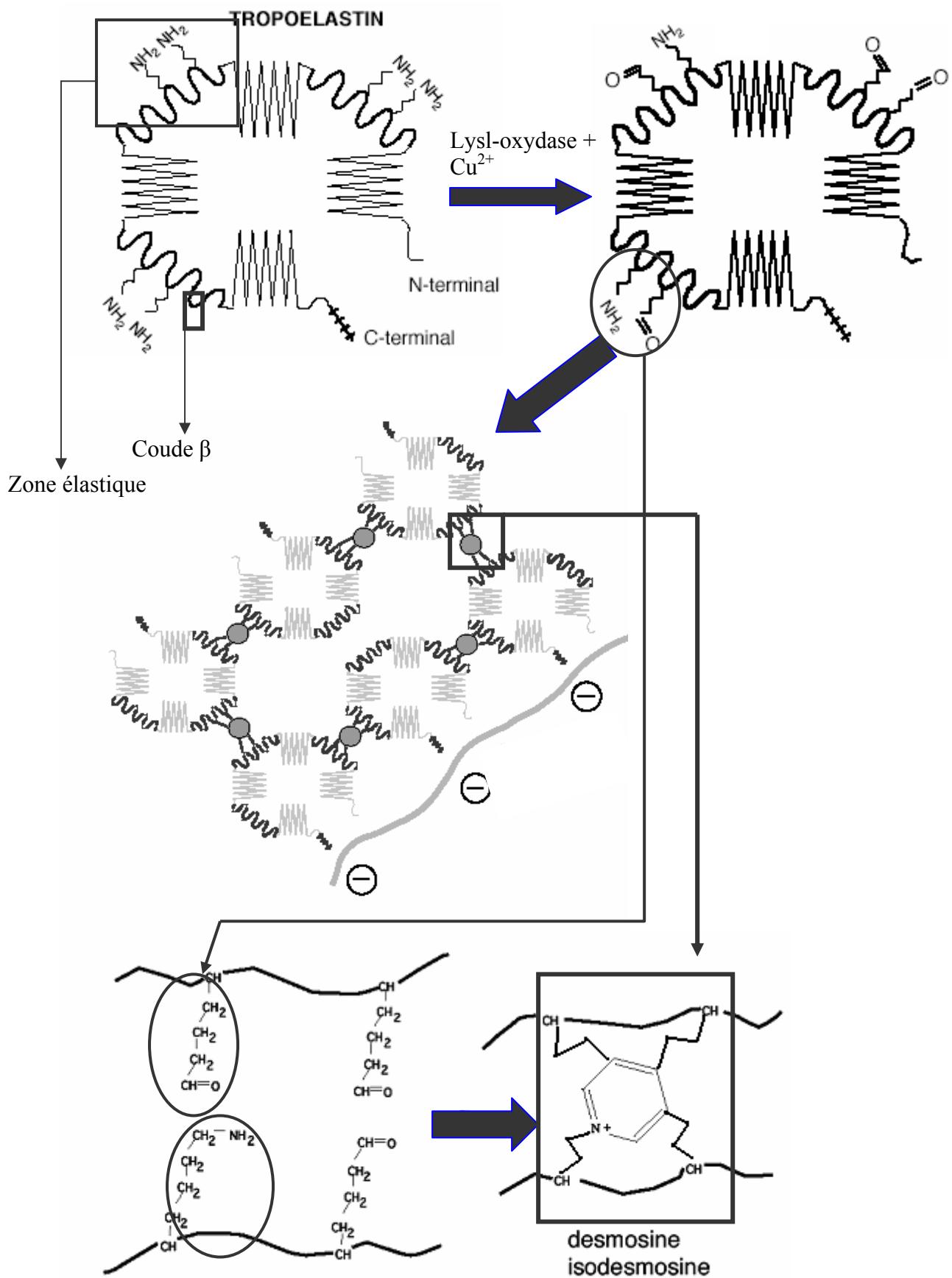


Figure IV)B.1 : formation de l'élastine.

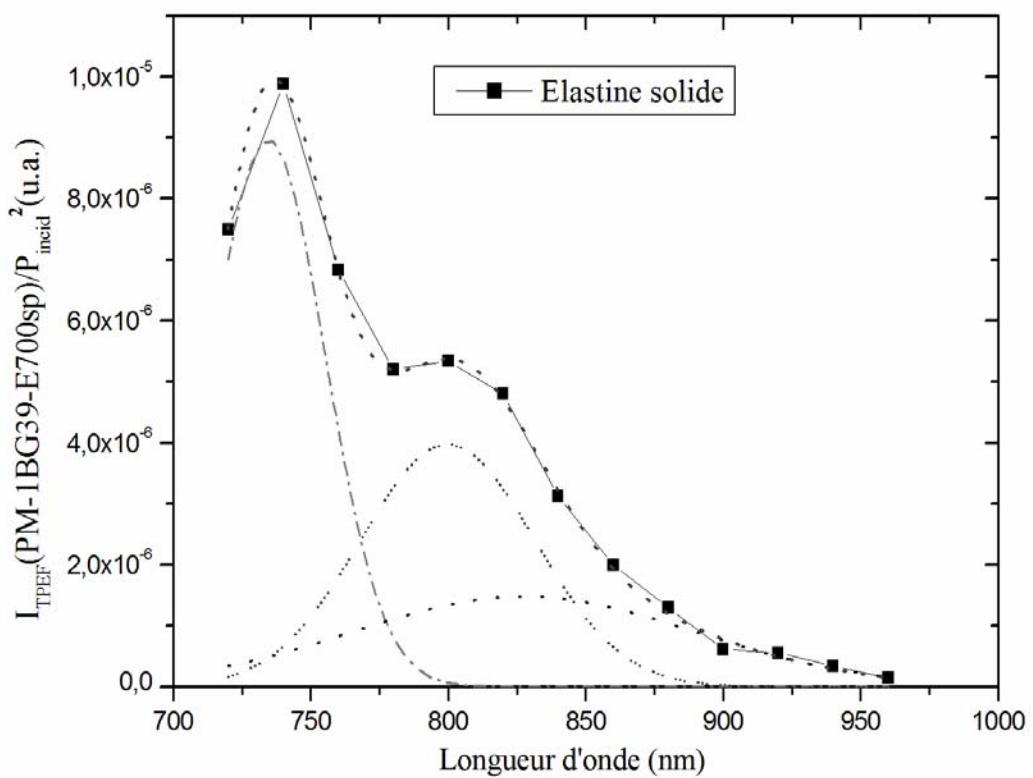
- Propriétés de fluorescence à deux photons :

Le spectre de fluorescence à deux photons est mesuré grâce au spectrofluorimètre décrit dans la partie A du chapitre II. Les mesures sont effectuées sur une poudre d'élastine issue de l'aorte humaine (référence Sigma : E6777, extraite suivant la méthode de Starcher afin de minimiser les ruptures des liaisons peptidiques). Il n'est pas possible d'obtenir la section efficace de fluorescence excitée à deux photons car la concentration pour cette macromolécule ne peut pas être définie. La poudre contient un mélange de macromolécules (entre 2000 et 70000Da).

La première mesure consiste à faire varier la longueur d'onde du rayonnement venant de l'oscillateur Ti : Saphir (atténué par un filtre 1NG3 et 1NG5 P~4mW), et pour chaque valeur mesurer l'intensité du signal de fluorescence sur le photomultiplicateur. Le signal de fluorescence est sélectionné par un filtre BG39 et un filtre E700sp. Nous présentons sur la figure IV)B.5 le rapport entre l'intensité détectée sur le carré de la puissance incidente en fonction de la longueur d'onde incidente.

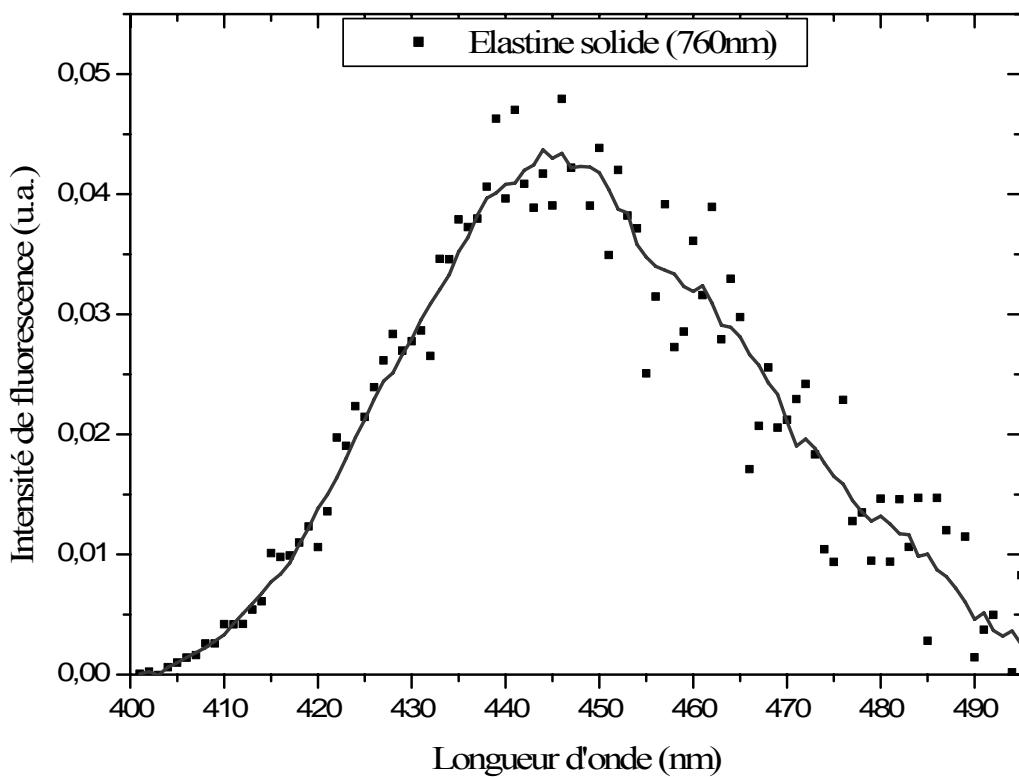
Le spectrofluorimètre possède une réponse spectrale assez plate sur la plage utilisée pour la mesure. L'observation du spectre sur la figure IV)B.5 montre la présence d'un pic vers 740nm, d'un second moins intense vers 800nm et d'un dernier pic vers 920nm. La figure IV)B.5 présente un ajustement par 3 gaussiennes centrée en 730nm (rose), 800nm (vert) et 830nm (bleu), la courbe rouge présente la somme de ces 3 fonctions, on trouve un très bon accord avec les résultats expérimentaux.

Nous pouvons comparer nos résultats avec ceux de R. Richards-Kortum obtenus en fluorescence excitée à un photon sur de l'élastine solide bovine. Trois pics sont identifiés dans les spectres d'excitation linéaires centrés autour de 350 nm, 410 nm et 450 nm [Richards-Kortum, 1996]. Les deux premières valeurs sont proches de celles que nous avons obtenues à 730 nm (365 nm) et 800 nm (400 nm). Il existe, par contre, un décalage plus important entre la valeur de 830 nm (415 nm) dans le spectre d'excitation à deux photons, et celle de 450nm obtenue dans le cas d'une excitation linéaire. Il n'est cependant pas incohérent d'obtenir des valeurs différentes entre les mesures effectuées dans le domaine linéaire et celles réalisées en non linéaire, les règles de sélection des transitions permises étant différentes dans les processus impliquant deux photons.



**Figure IV)B.2 :** Spectre d'excitation de la fluorescence de l'élastine solide (aorte humaine). L'intensité est normalisée par le carré de la puissance incidente. Ce spectre d'excitation peut être ajusté par la somme de 3 gaussiennes centrées respectivement à 730nm (—, largeur : 40nm), 800nm (...., largeur : 60nm) et 830nm (., . . ., largeur : 120nm). La somme est représentée en traits pointillés noirs.

Connaissant les conditions optimales d'excitation, nous pouvons mesurer le spectre de fluorescence excité à deux photons pour le même échantillon. Pour ce faire, nous plaçons devant le détecteur un monochromateur motorisé. L'excitation se fait à 760nm, en vérifiant la non saturation de l'absorption. Le maximum dans le spectre d'émission étant situé vers 450nm, une correction de la réponse spectrale du filtre BG39 placé devant le détecteur est nécessaire. Le spectre est suffisamment étroit pour négliger en première approximation l'efficacité spectrale du réseau en réflexion placé dans le monochromateur. Le spectre est effectué avec des fentes d'entrée et de sortie correspondant à une résolution de 2nm. Le signal observé est de faible intensité ce qui explique les fortes fluctuations dans le spectre. Le résultat est présenté sur la figure IV)B.3.



**Figure IV)B.3 :** spectre d'émission de l'élastine solide (aorte humaine) excitée à 760nm, la courbe correspond à un lissage effectué sur 10 points.

Le maximum d'émission est centré à 445 nm (pour une excitation à 760 nm (380 nm)), cette valeur est compatible avec les valeurs des maxima des spectres d'émission situés à 420 nm et 500 nm obtenus en régime linéaire pour des excitations respectivement situées à 350 et 410 nm [Richards-Kortum, 1996]. Les chromophores fluorescents de l'élastine sont, pour le moment, mal identifiés. Il est envisagé que ce soient les acides aminés desmosines et isodesmosines spécifiques de l'élastine et comportant un cycle pyridine ; cette hypothèse n'a pour le moment pas été vérifiée.

Il est possible de comparer nos mesures effectuées *in vitro* avec celles réalisées *in vivo* en microscopie sur de l'artériole de rat [Zipfel, 2003]. Le maximum d'émission est situé à 480 nm (il existe également un pic de plus faible intensité centré à 400 nm) pour une excitation non linéaire à 740 nm dans le tissu. Cette valeur est différente de celle que nous avons obtenue *in vitro* dans des conditions d'excitations très semblables (excitation à 760nm et émission centrée à 445 nm). L'interprétation de ces différences est très délicate en raison des

nombreux composés non identifiés présents dans le tissu élastique. Il peut exister des différences de structure entre l'élastine des tissus et celle obtenue en poudre, d'autant plus que les modifications induites par la méthode d'extraction ne sont pas connues [Starcher, 1976]. Par la suite, nous étudierons les feuillets d'élastine présents dans les vaisseaux. Il est impossible de prédire l'effet de cette organisation et de son environnement sur les propriétés spectroscopiques de l'élastine à partir des expériences que nous avons mené *in vitro*.

Cette étude montre donc qu'une optimisation des paramètres d'excitation et d'observation sera nécessaire directement sur un échantillon de tissu en microscopie.

Ces résultats suggèrent que les caractérisations spectroscopiques des constituants doivent surtout être effectuées *in situ*, grâce à un spectromètre installé sur la ligne de mesure du microscope employé. Dans notre travail d'imagerie, nous avons préféré optimiser le choix de la longueur d'onde d'excitation et du filtre d'observation en procédant à différents essais afin de pouvoir nous concentrer sur des applications de pharmacologie et de toxinologie.

Intéressons-nous à présent au collagène : utilisé comme source de contraste en microscopie SHG.

## ii. Collagène

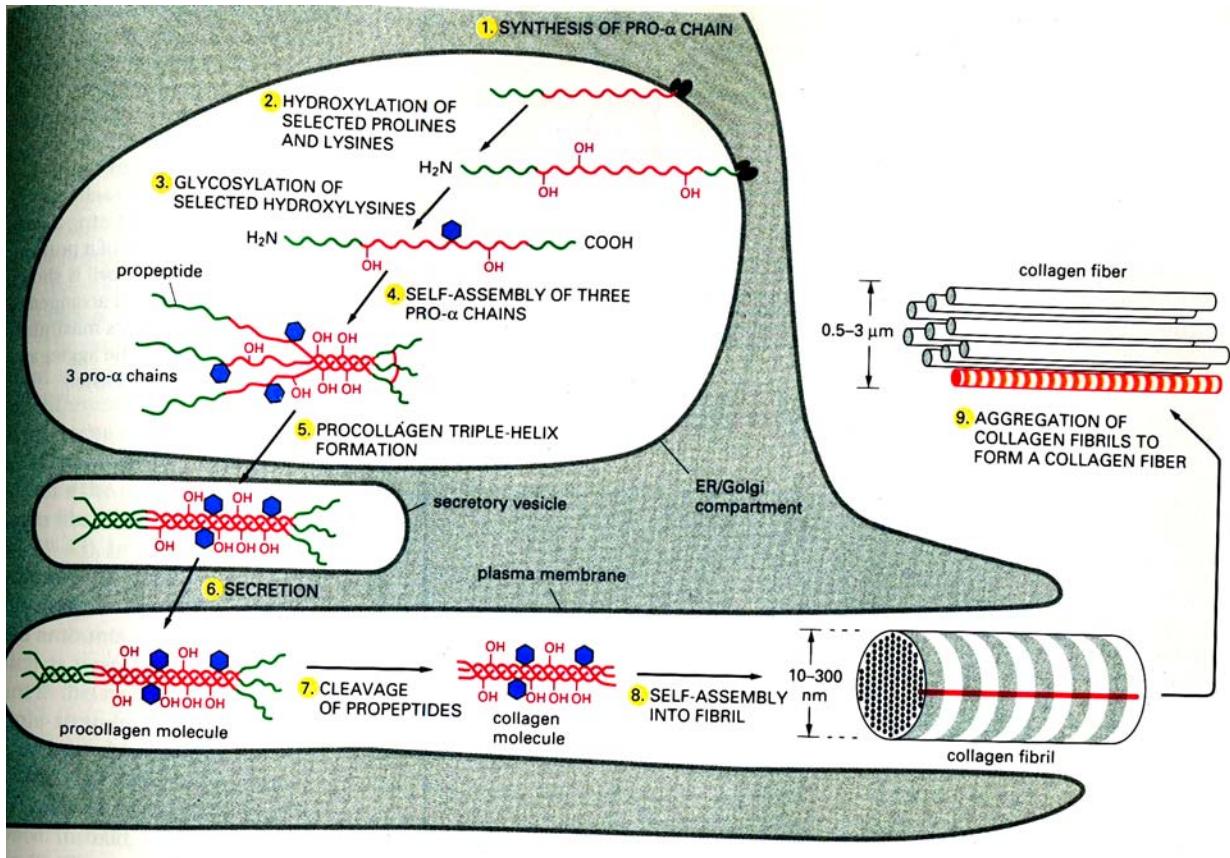
Il a été montré que le collagène de type I, II ou III organisé en fibrilles était une source efficace de SHG [Zipfel, 2003]. Une hypothèse a été présentée pour expliquer ce résultat lié à l'organisation spatiale de ces protéines : leur chiralité à l'échelle moléculaire serait à l'origine d'une grande efficacité en SHG [Campagnola, 2002]. En effet, les molécules de collagène sont constituées en triple hélice, et s'alignent au sein de fibrilles. Afin de mieux comprendre l'origine du signal de SHG, nous avons mené des expériences de SHG en surface identiques à celles effectuées sur l'ASTB. Nous cherchons à établir quel est (sont) le(s) type(s) de chiralité impliqué(s) et quelle est l'importance des contributions chirales.

● Contexte biologique :

Le collagène est la glycoprotéine la plus abondante dans les organismes animaux : il représente 25% de la masse de protéines totale. C'est une protéine qui intervient dans le tissu conjonctif et apparaît donc dans les organismes pluricellulaires. Il permet l'assemblage des cellules en tissus, de tissus en organes et des organes en organismes.

26 types de collagène ont été identifiés à ce jour, et seulement une douzaine sont bien identifiés. Ils diffèrent par l'enchaînement des bases qu'ils contiennent et par la structure supramoléculaire qui en découle (réseaux ou fibres) [Bornstein, 1980] [Eyre, 1980]. Une fibre de collagène (type I) est constituée de la manière suivante (figure IV)B.4) :

- Les précurseurs de la macromolécule de collagène sont les procollagènes. Le procollagène résulte de l'assemblage de 3 chaînes polypeptidiques glycolysées dites  $\alpha$  (diamètre 1,5nm). Chaque chaîne  $\alpha$  ( $100\text{kDa} = 1,66 \cdot 10^{-19}\text{g}$ ), enroulée en hélice, contient une séquence répétitive caractéristique d'acides aminés (du type: glycine, x, y). Cette séquence permet d'identifier chaque type de chaîne. Suivant le type de collagène, les 3 chaînes peuvent être identiques. Elles ne présentent pas la même séquence d'un type de collagène à un autre. Le collagène contient des résidus proline, hydroxylysine et hydroxyproline.
- La macromolécule de collagène résulte du clivage des extensions peptidiques N et C- terminaux (une à chaque extrémité des chaînes). Elle possède une longueur de 300 nm, et un diamètre de 1,6 nm.
- Les molécules de collagène s'associent ensuite pour former des fibrilles d'un diamètre inférieur à 300 nm. Une striation périodique apparaît en microscopie électronique à balayage avec un pas régulier de 60 nm résultante de la juxtaposition de molécules décalées d'un quart de leur longueur.
- Les fibrilles s'associent enfin en fibres de collagène de diamètre variant entre 0,5 et 3  $\mu\text{m}$ . Les fibres peuvent se regrouper en faisceaux.



**Figure IV)B.4 : formation du collagène de type I. (The Cell).**

Il existe des pathologies liées directement au collagène, la fibrose en sera un exemple traité rapidement dans la suite. Il nous permettra de montrer le pouvoir de la microscopie multiphotonique pour étudier cette pathologie. On peut citer également la maladie des os de verre (Albers-Schönberg) ou certains problèmes de cicatrisation.

Il existe d'autres pathologies où intervient également l'élastine comme le syndrome de Marfan, ou encore l'athérosclérose [Prockop, 1984]. Mentionnons également le problème du vieillissement des tissus qui fait intervenir des modifications conjointes de ces deux protéines [Robert, 1989].

Nous présentons sur le tableau IV)B.1 les différents types de collagène les plus répandus.

Type	Composition en chaîne $\alpha$	Organisation / tissus	Cellules productrices
I	$\alpha_1(I)_2 \alpha_2(I)$ ou $\alpha_1(3)$	fibrilles / derme, tendon, os, paroi vasculaire, cornée	fibroblastes, kératinocytes, ostéoblastes (cellules à la périphérie de l'os)
II	$\alpha_1(II)_3$	fibrilles / corps vitré de l'œil, cartilage, disque entre vertèbres	chondrocytes (cellules du cartilage), hyalocytes (cellules du corps vitreux)
III	$\alpha_1(III)_3$	fibrilles / derme, paroi vasculaire	cellules musculaires, fibroblastes
IV	$\alpha_2(IV)_2 \alpha_1(IV)$ ou $\alpha_1(IV)_3$ ou $\alpha_2(IV)_3$	réseau / lames basales	cellules endothéliales
V	$\alpha(B)_2 \alpha(A)$ ou $\alpha(B)_3$ ou $\alpha(A)_3$ ou $\alpha(A)\alpha(B)\alpha(B)$	fibrilles (avec I) / péricellulaire, muscle, placenta	cellules musculaires
VI	SC1 SC2 SC3 proportions inconnues	chaines courtes / cellules musculaires lisses	cellules musculaires lisses (?)
VII	3 chaînes différentes	fibrilles ancrées en réseau	chondrocytes (?)
VIII	3 chaînes différentes	sous endothélium vasculaire	cellules endothéliales
IX	$\alpha_1(IX)\alpha_2(IX)\alpha_2(IX)$	fibrilles latérales (avec II) / cartilage,etc..	chondrocytes, hyalocytes
XI	$\alpha_1(XI)\alpha_2(XI)\alpha_2(XI)$	fibrilles (avec II) / cartilage, etc...	chondrocytes, hyalocytes
XII	$\alpha_1(XII)_3$	fibrilles latérales (avec I) / tendon, ligaments	fibroblastes, ostéoblastes

**Tableau IV)B.1 :** différents types de collagène avec leur composition, leur organisation, leur localisation et les sources de leur production. Les points d'interrogation désignent une hypothèse non vérifiée expérimentalement. 26 types de collagène ont été identifiés actuellement.

Nous allons donc étudier les propriétés optiques du collagène I qui est un excellent générateur d'harmonique et peut donc être utilisé comme agent de contraste endogène en imagerie SHG. Nous allons essayer notamment de discerner l'importance de la chiralité dans le doublage de fréquence induit par le collagène.

- Propriétés de génération de second harmonique

Afin d'évaluer l'importance de la chiralité dans le signal de SHG produit par le collagène I, nous allons étudier un film de collagène I. Nous nous intéressons aux expériences de LD<sub>p,s</sub>, CD<sub>p,s</sub> et ORD décrites au chapitre I) partie B.

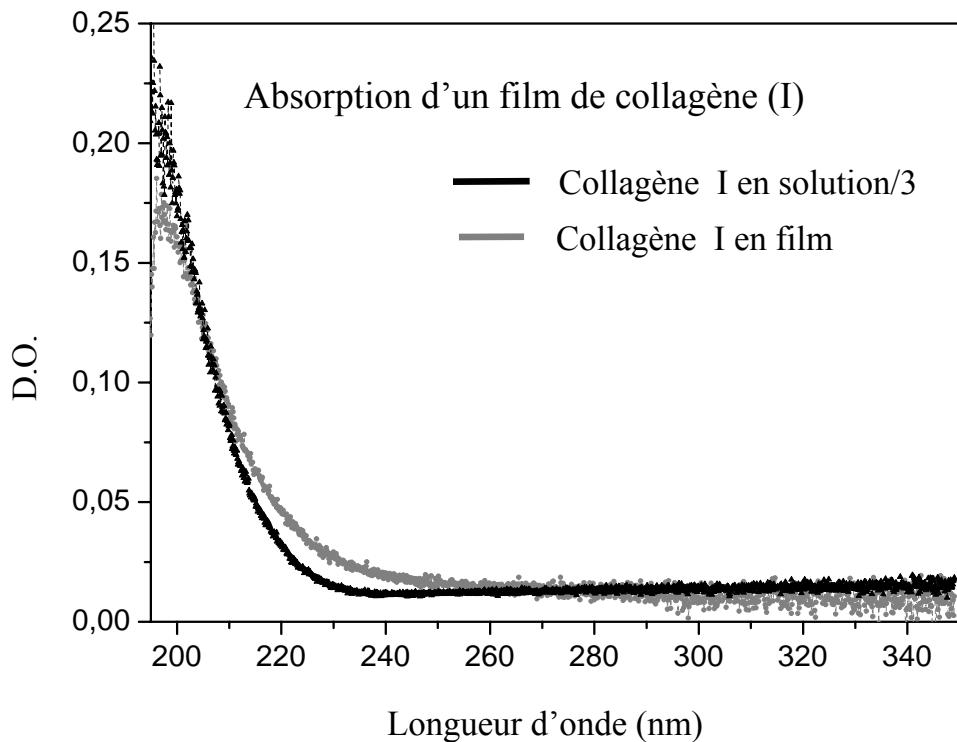
➤ Fabrication des films de collagène :

Pour les collagènes de type I nous allons utiliser les groupements hydroxyles latéraux de leur chaîne pour fixer les fibrilles sur un substrat hydrophile (même traitement qu'au chapitre III partie B pour l'ASTB).

Le collagène de type I est une protéine soluble en milieu acide acétique ( $[CH_3COOH]=0,1\text{mol/L}$ ), il possède de nombreux groupements hydroxyles présents dans les résidus hydroxylysine et hydroxyprolyne. La préparation du substrat de silice est identique à celle déjà utilisée pour fixer l'ASTB. Après rinçage et traitement au mélange piranha, les substrats sont séchés à l'azote gazeux.  $40\mu\text{L}$  d'une solution de collagène I ( $1\text{mg/mL}$  dans un milieu acétique à  $0,1\text{mol/L}$ ) sont déposés à l'aide d'un Pipetman<sup>©</sup> et d'un cône sectionné de  $100\mu\text{L}$  sur toute la surface circulaire de  $10\text{mm}$  de diamètre. Le recouvrement est grandement facilité par les propriétés hydrophiles de la surface. Après un temps d'interaction de 10 minutes, le substrat est rincé à l'eau ultrapure (conductance  $>18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ). L'échantillon est alors placé sous vide durant une à deux heures pour assurer l'évaporation de toutes traces d'eau ou de solvant.

Afin de vérifier le dépôt sur le substrat, nous mesurons son spectre d'absorption ultraviolet. En effet, nous sommes sensibles à l'absorption de la liaison peptidique vers  $200\text{nm}$ . Afin d'obtenir une absorption significative, nous itérons 2 ou 3 fois le processus de dépôt-séchage. Il se peut que des liaisons entre brins facilitent la fixation du collagène sur la surface. Nous avons utilisé une procédure à 3 itérations en contrôlant l'homogénéité du dépôt lors des expériences de génération de second harmonique en nous plaçant à différentes positions sur l'échantillon comme pour la mesure du spectre d'absorption (figure IV)B.5).

Nous trouvons en comparant l'absorption à  $200\text{nm}$  des substrats ( $DO(200\text{nm})=0,17$ ) à celle d'une solution de collagène I dans de l'acide acétique ( $0,1\text{mol/L}$ ) à  $1\text{mg/mL}$  de  $DO(200\text{nm})=0,5$ , que la densité surfacique est de  $34\mu\text{g/cm}^2$ . Les fibrilles n'ont pas toutes la même longueur ni le même diamètre, il n'est donc pas possible de définir une concentration en quantité de matière.



**Figure IV)B.5 :** absorption des films de collagène déposés sur un substrat de silice.

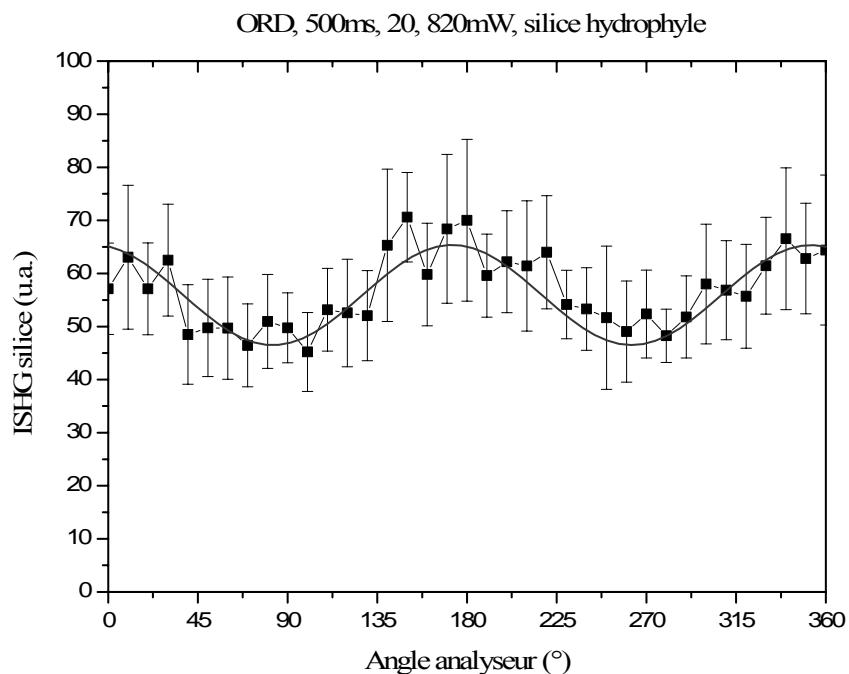
➤ Mesures d'activité optique :

Pour ces expériences nous utilisons la méthode de détection 2, décrite au chapitre II dans la partie B. Nous commençons par caractériser un substrat nu hydrophile, pour identifier son influence dans le signal de SHG en présence de collagène.

Substrat en silice :

Les expériences sont réalisées à 800nm (820mW) avec le dispositif décrit au chapitre partie B figure II)B.1. Nous plaçons devant le photomultiplicateur deux filtres 2BG39 et un filtre interférentiel à 400nm (Transmission 60%, largeur spectrale à mi-hauteur du pic de transmission 20 nm). La détection a lieu en comptage d'impulsions fournies par le module

photomultiplicateur sur 20 intervalles de 500 ms chacun. On calcule ensuite une moyenne sur ces 20 mesures. Les barres d'erreur verticales apparaissant sur les graphiques correspondent aux écarts quadratiques moyens. La moyenne est représentée par un carré noir en nombre de photons pour 500 ms. L'intensité du signal de SHG mesuré en fonction de l'angle de l'analyseur est représenté sur la figure IV)B.6



**Figure IV)B.6 :** signal ORD (400nm), pour un substrat de verre nu. L'ajustement par un cosinus carré est représenté en noir.

Un fond continu non nul est présent, il correspond au bruit mesuré par la chaîne de détection en l'absence de lumière incidente. Ce bruit est de 40 photons pour 500ms, ce qui correspond au bruit d'obscurité des modules photomultiplicateurs (80 photons/s). Il sera soustrait par la suite.

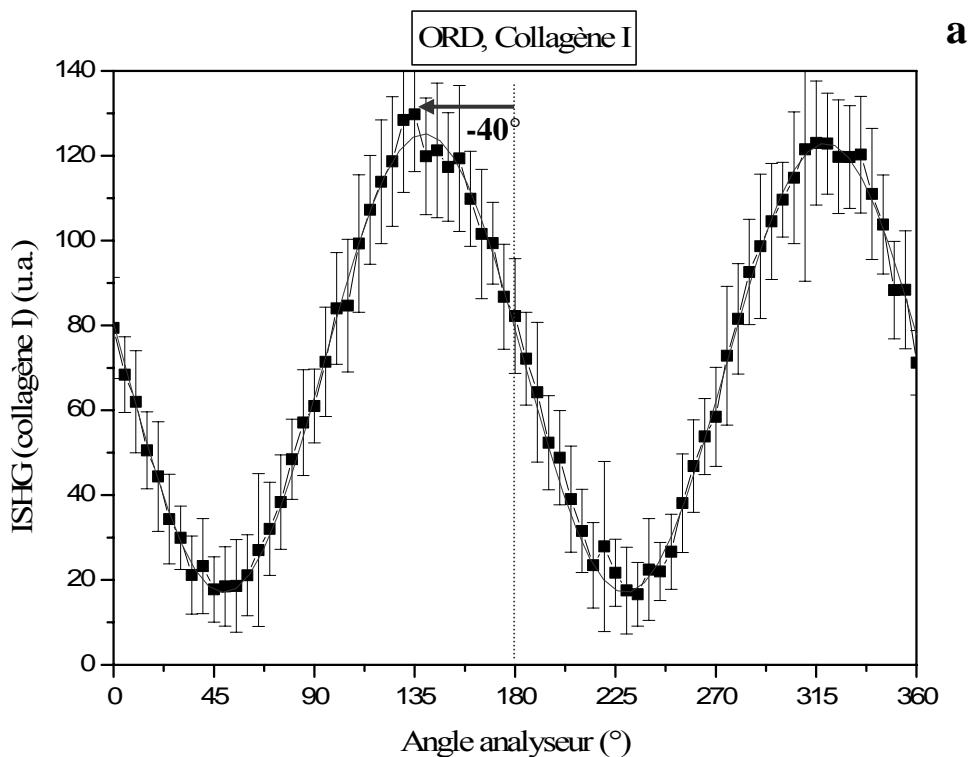
Il existe un signal de second harmonique dû à la surface de la silice, qui peut atteindre 20 photons détectés en 500ms. Les signaux de LD et CD (non représentés ici) sont symétriques par rapport à la valeur médiane de l'angle formé entre la lame à retard utilisée et la direction de la polarisation rectiligne incidente.

Un ajustement par un cosinus carré est représenté par la courbe rouge sur la figure IV)B.6 correspondant à une valeur de  $\Phi_{mp}$  de  $173^\circ \pm 3^\circ$ . Le substrat ne participe donc pas à l'activité optique éventuelle que l'on pourra observer.

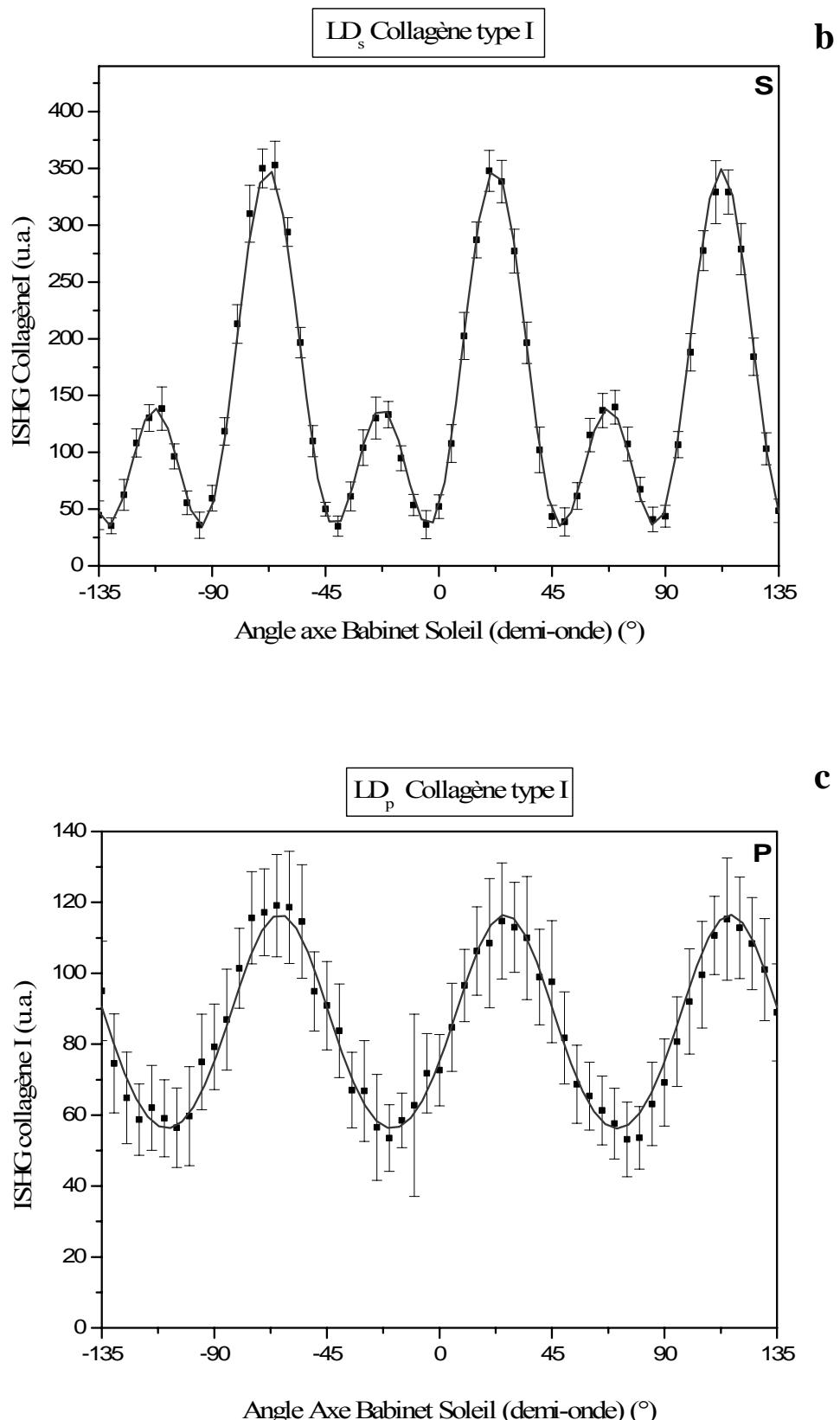
Ces mesures nous permettent également de nous assurer de l'alignement correct de l'expérience.

#### Mesures sur le collagène de type I :

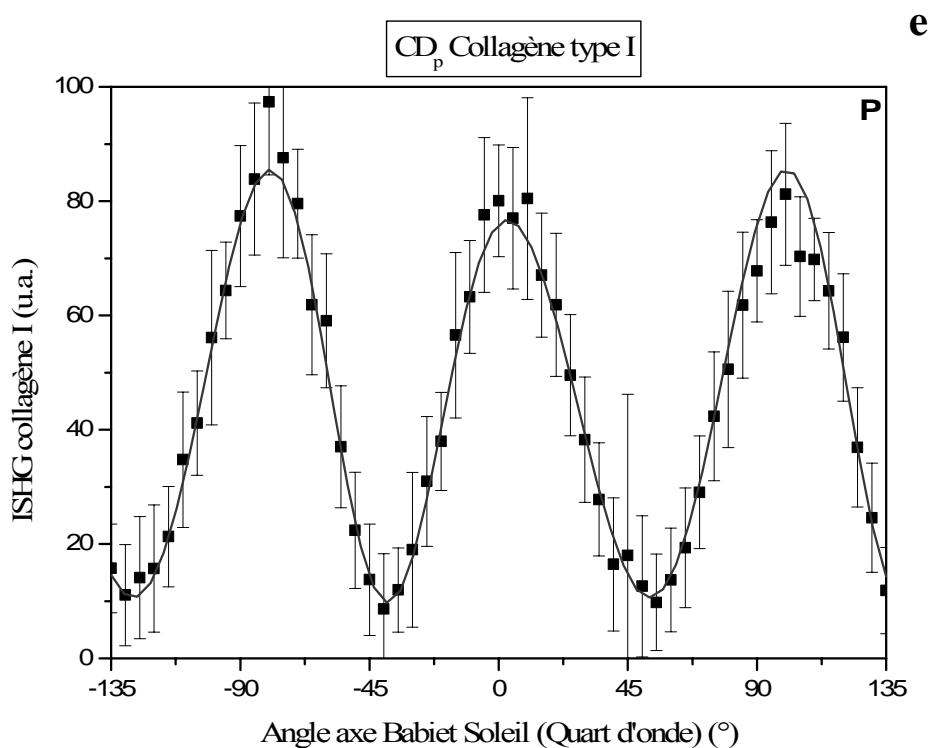
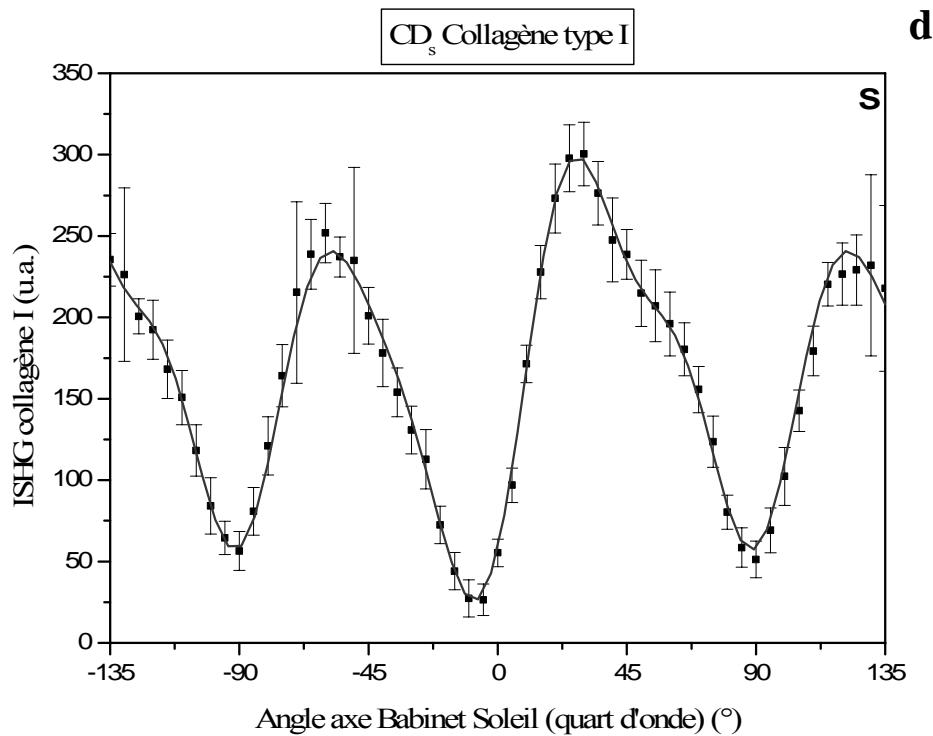
Nous présentons sur les figures IV)B.7.a,b,c,d,e, les mêmes mesures réalisées sur un film de collagène I à  $37\mu\text{g}/\text{mm}^2$ .



**Figure IV)A.7.a :** Intensité du signal de SHG (400nm) en fonction de l'angle de l'analyseur pour une polarisation incidente rectiligne sur un substrat de verre hydrophile. La courbe noire correspond à un ajustement par un cosinus carré des valeurs mesurées. Les paramètres de l'ajustement sont encadrés (expression I.B-37).



**Figure IV)A.7.b :** Intensité de la composante polarisée *s* du signal de SHG (400nm) en fonction de l'angle de rotation d'une lame demi onde placée sur le faisceau incident. **c :** idem *b*, pour la composante polarisée *p* du signal de SHG. Même échantillon qu'en *a*.



**Figure IV)A.7.d :** Intensité de la composante polarisée *s* du signal de SHG (400nm) en fonction de l'angle de rotation d'une lame quart d'onde placée sur le faisceau incident. **e :** idem *d*, pour la composante polarisée *p* du signal de SHG. Même échantillon qu'en *a*.

➤ Observations :

- ◆ L'amplitude du signal est bien au-delà du niveau du bruit dans toutes les expériences (40photons/0,5s, soustrait du signal brut), on compte jusqu'à 400 photons/0,5s ( $LD_s$ ). Ce signal de SHG est dû à la présence de collagène sur la surface.
- ◆ Les signaux sont tous  $\pi$ -périodiques, ce qui traduit un réglage optimal de l'alignement du montage.
- ◆ Le collagène n'est pas détruit après illumination, autrement nous assisterions à une diminution du signal de SHG généré au cours des expériences.
- ◆ Les signaux sont invariants par un déplacement latéral de l'échantillon.
- ◆ De plus, une rotation de l'échantillon ne modifie pas les signaux détectés, ceci prouve qu'il n'y a pas d'ordre établi sur la surface, que les fibres se repartissent suivant toutes les directions du plan de l'échantillon. L'activité optique ne provient pas d'un assemblage des fibres dans une direction particulière à la surface. Il y a une répartition isotrope des fibres.
- ◆ Les courbes sont toutes dissymétriques.
- ◆ Nous observons une activité optique pour le collagène de type I en ORD, et LD et CD.
- ◆ A partir des courbes précédentes nous mesurons les valeurs :
  - $\Phi_{mp} = -40^\circ \pm 2^\circ$
  - $LDs\text{-SHG} = +74\% \pm 3\%$
  - $LDp\text{-SHG} = +46\% \pm 10\%$
  - $CDs\text{-SHG} = +14\% \pm 15\%$
  - $CDp\text{-SHG} = +14\% \pm 20\%$
- ◆ Les déterminations des valeurs de différence circulaire sont très imprécises en raison de leur très faible valeur.

➤ Interprétations :

- ◆  $\Phi_{mp} = -40^\circ$  dans le cas du collagène I, et les valeurs de LD (p et s) sont non nulles, hors résonance (400 nm). Ces observations sont la preuve que l'activité optique observée provient d'une chiralité par couplage excitonique. Une fausse intuition suggèrerait, à partir de la structure du collagène en triple hélice, que

l'activité optique de SHG proviendrait d'un mouvement hélicoïdal des charges. L'activité optique provient principalement d'un effet dipolaire électrique.

- ◆ On montre, à partir d'un ajustement obtenu d'après l'expression I.B-33, en choisissant une valeur de  $f_p$  réelle et unitaire, que  $f_s$  est réel. En utilisant l'expression :  $\tan \Phi_{mp} = f_s/f_p$ , on trouve que l'importance de ces deux coefficients est alors du même ordre de grandeur ( $f_s = -0,83$ ). La contribution de la chiralité ( $f_s$ ) au signal de SHG pour un film isotrope de collagène est du même ordre de grandeur que la contribution achirale ( $|f_p|$ ).

Conclusion :

Les expériences de surface réalisées sur des arrangements isotropes des fibrilles de collagène I nous ont permis d'isoler la composante chirale intervenant dans le signal de SHG. Elles nous ont permis de montrer que l'activité optique de SHG est d'origine dipolaire électrique. Nous pouvons estimer quantitativement quel est le facteur d'exaltation du signal de second harmonique par la chiralité. En écrivant l'intensité rayonnée à  $2\omega$  pour un faisceau incident polarisé p, il est possible de faire apparaître les coefficients  $f_p$  (ne contenant que des termes achiraux) et  $f_s$  (contenant seulement des termes chiraux) :

$$\begin{aligned} I(2\omega) &\propto |E(2\omega)|^2 = |E_s(2\omega)|^2 + |E_p(2\omega)|^2 \\ &= |f_s E_p|^2 + |f_p E_p|^2 = (|f_s|^2 + |f_p|^2) I_p^2(\omega) \end{aligned}$$

Si  $f_p$  vaut 1 alors  $f_s$  vaut -0,83, ce qui conduit à une exaltation par un facteur approximatif de 2 du signal de second harmonique (à 800 nm). Cette exaltation du signal par la chiralité des molécules de collagène fibrillaire ne peut donc pas expliquer à elle seule le signal important détecté dans les tissus.

En effet, dans la matrice extracellulaire, nous ne sommes pas en présence d'une organisation isotrope des fibres de collagène comme c'est le cas dans nos expériences en surface. Celles-ci sont organisées en faisceaux, il existe des effets supplémentaires d'interférences constructives. La valeur de l'intensité détectée provient surtout de la grande densité de molécules alignées dans une même direction.

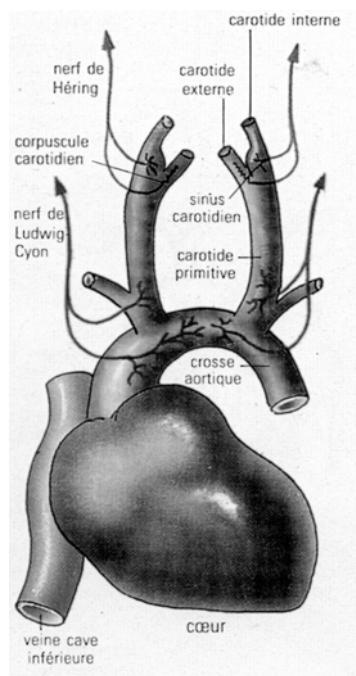
C'est pour cette même raison que les zones contenant du collagène de type IV n'émettent pas de SHG (lame basale par exemple). Les molécules de collagène IV sont pourtant des triples hélices chirales mais les molécules de collagène IV sont organisées en réseau à la différence des molécules de collagène de type I qui s'organisent en fibrilles.

## IV) C. Application de la microscopie non linéaire à l'étude de tissus vivants

L'objectif de ce travail est de montrer que l'imagerie non linéaire est une approche outil très performante pour étudier la morphologie et la pharmacologie du système artériel.

La résistance et la résilience des artères dépendent du collagène et des protéines fibreuses d'élastine. L'élastine confère au tissu son élasticité tandis que le collagène assure la rigidité de la paroi en limitant son extensibilité. Les collagènes de type I et III représentent la majorité du collagène de l'aorte. Nous utilisons ces deux sources de contraste endogène complémentaires pour imager le tissu vivant artériel. Nous étudions la morphologie des artères de Rat, plus spécifiquement, d'échantillons d'aorte prélevés au niveau de la crosse aortique ainsi que d'échantillons de l'artère carotide interne (Figure IV)C.1)

### i. Matériel biologique



**Figure IV)C.1 :** schéma représentant le cœur et le départ du système artériel (aorte et artère carotide).

Les artères comportent surtout du collagène de type I et III (80-90% de la quantité totale de collagène, et une très faible proportion de collagène V), et très peu de collagène non fibrillaire comme ceux de type IV, VI et VIII [Kielty, 1993]. Le tissu artériel contient également de l'élastine qui lui procure son élasticité. Les liaisons entre le collagène (rigide) et l'élastine donnent au tissu les propriétés nécessaires à la conduction du flux sanguin [Catell, 1996], [Yu, 1996]. Les propriétés mécaniques du tissu artériel évoluent au

cours du vieillissement. La rigidité des artères est caractérisée par une augmentation du rapport collagène-élastine et par la présence de dépôts diffus de calcium et de lipides [Robert, 1989]. Le protocole d'observation en microscopie non linéaire mis au point ici pourra être mis à profit pour étudier le vieillissement des vaisseaux (ou d'autres pathologies comme l'artériosclérose).

- Prélèvements :

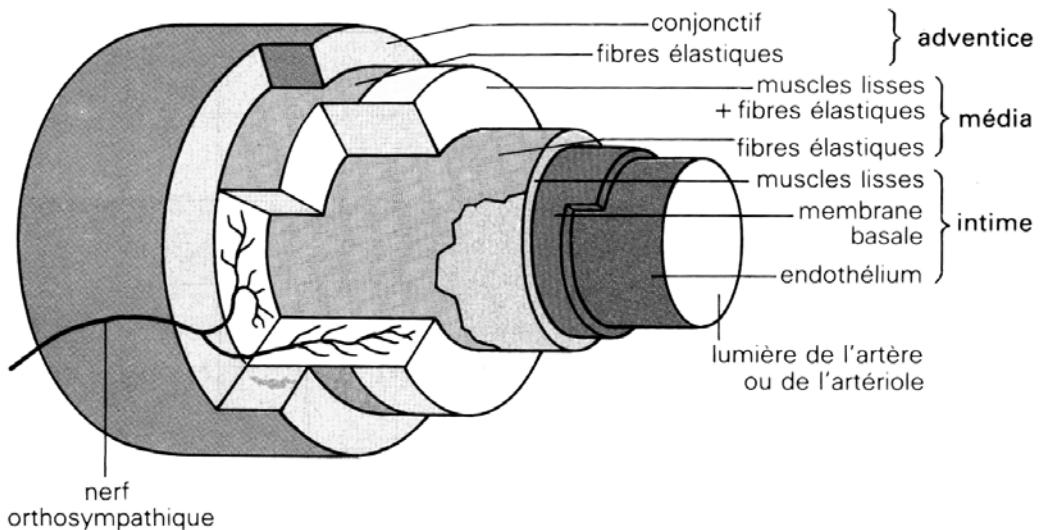
Les animaux (de race Sprague-Darley) sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de thiopental (100 mg/kg). Le tissu artériel (aorte et carotide, figure IV)C.7 a et b) est prélevé, puis rincé du sang qu'il contient. Des sections (de longueur comprise entre 500 et 700 $\mu$ m) sont prélevées à l'aide de ciseau d'ophtalmologie. La morphologie des tissus est étudiée soit sur des sections transversales (ST), soit à la surface des ST ouvertes longitudinalement (SL). Les différentes préparations permettent d'imager les structures des différentes couches tissulaires constituant le vaisseau.

Des échantillons sont placés dans la solution physiologique de Tyrode oxygéné dont la composition est en mmol/L : NaCl : 135 ; KCl : 5,4 ; CaCl<sub>2</sub> : 2 ; MgCl<sub>2</sub> : 1 ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,33 ; glucose : 10 ; HEPES (NaOH) : 10 ; pH = 7,35. Le milieu de Tyrode est un tampon acido-basique permettant la conservation des tissus isolés.

Les sections de tissu artériel sont placées dans des boîtes de Pétri en plastique (dimensions : 10X35mm). Ces boîtes sont transparentes aux rayonnements visibles ce qui permet leur utilisation en microscopie. Le fond de certaines boîtes est tapissé d'un gel transparent de Sylgard sur lequel sont fixés les échantillons SL à l'aide de minuties enfoncées dans le gel.

- Structure du tissu :

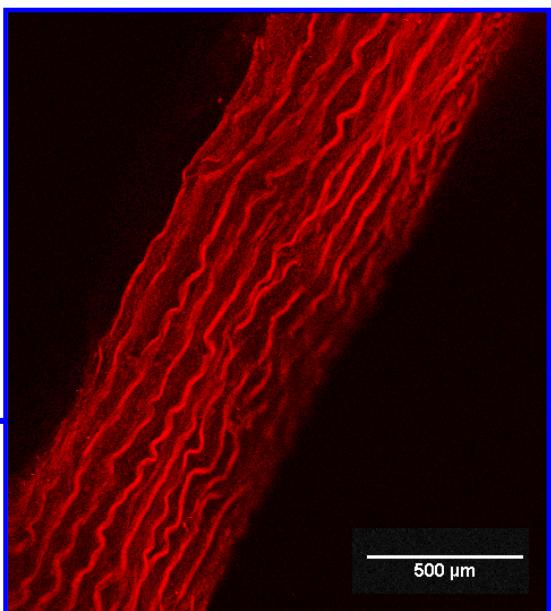
L'aorte ou les artères carotides présentent une structure semblable (figure IV)C.2). Un ensemble de fibres de collagènes (notamment de type I fibrillaire) entoure des feuillets d'élastine. La « vaso-activité » (vasodilatation ou vasoconstriction) est assurée par des cellules musculaires lisses présentes entre l'élastine et le collagène.



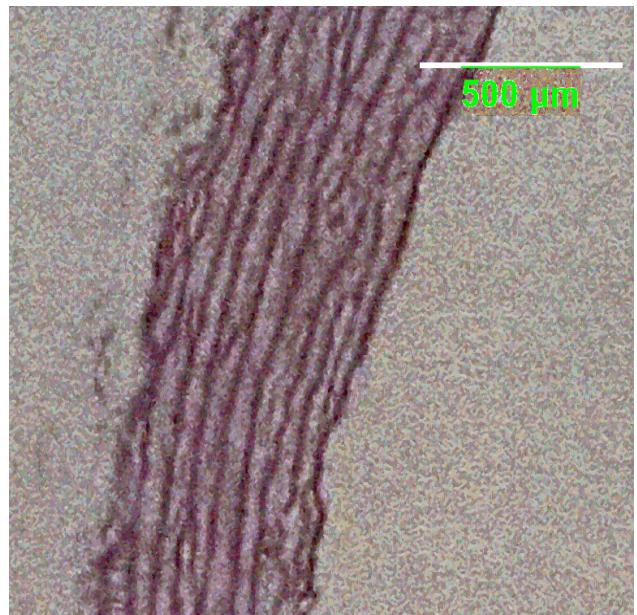
**Figure IV)C.2 : structure d'une artère.**

- Etude des coupes ST :

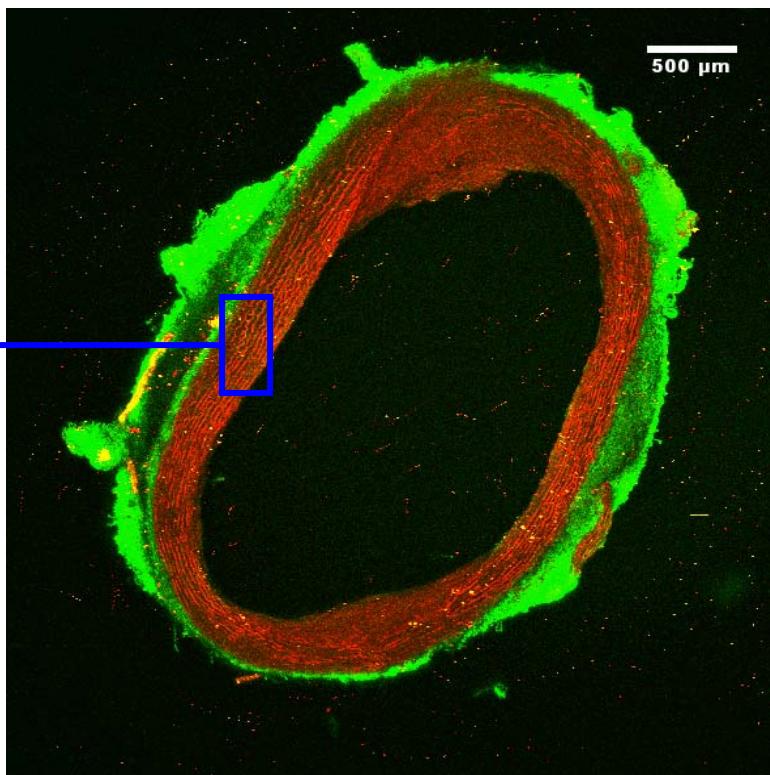
Après différents essais, nous avons choisi de travailler sur les coupes ST à une longueur d'excitation de 860nm et une puissance incidente de 15mW. Ces valeurs présentent un compromis entre la profondeur de pénétration dans le tissu, le seuil de dommage pour l'échantillon et une efficacité importante de l'élastine en TPEF. La valeur de la longueur d'onde a également été choisie afin de pouvoir imager le collagène de type I par génération de second harmonique. Les filtres sont disposés sur chaque voie du microscope afin de ne transmettre que le signal de SHG (HQ430/20), ou de TPEF (GG3 ou H535 /50) (cf partie IV)B). L'élastine et le collagène présentent respectivement une excellente efficacité de TPEF et de SHG. Ceci permet de travailler parfois avec des objectifs de faible ouverture numérique et de faible grossissement transversal, possédant donc un champ assez large pouvant dépasser 1mm. Ce dispositif est important pour imager toute la section d'une artère par exemple, il est alors possible d'étudier l'organisation globale du tissu à l'échelle millimétrique.



**Figure IV)C.4:** Image TPEF de feuillets d'élastine sur une aorte de Rat. Filtre GG435. Objectif Zeiss4X ON 0.2 à air. Excitation 860nm 25mW. Temps par pixel : 10µs.



**Figure IV)C.3:** coupe histologique d'une aorte de Rat colorée par la cathéchine fuchine observée en microscopie en transmission objectif à air 20X O.N. : 0.5. (Pr. Godeau).



**Figure IV)C.5 :** Image d'une aorte de Rat (ST) en TPEF(rouge, filtre GG435) et SHG(verte, filtre HQ430/20). Excitation 860nm 25mW. Projection de 70 plans espacés de 10µm (épaisseur 700µm), projection de l'intensité moyenne, temps par pixel : 10µs. Objectif Zeiss 4X ON 0.2 à air.

Signal de TPEF : mise en évidence des feuillets d'élastine.

L'image IV)C.4 présente une coupe ST d'une aorte du Rat. Elle est en tout point comparable à celle en IV)C.3 obtenue (par le Pr. Godeau, Université Paris V, Montrouge avec lequel nous collaborons) sur une coupe histologique colorée en microscopie par transmission montrant les feuillets d'élastine colorés par la catéchine fuchsine réalisée. Dans la coupe ST, nous identifions donc le signal de TPEF comme provenant de l'élastine. L'élastine est caractérisée par une structure en feuillets que nous retrouvons à la fois dans les coupes d'aortes et d'artères carotides. D'autres images obtenues sur le tissu aortique en TPEF confirment cette identification [Parassi, 2000]. Le nombre apparent de feuillets d'élastine ( $12 \pm 2$ ) dans l'aorte (figure IV)C.4) est plus important que dans le cas de l'artère carotide ( $6 \pm 1$ , sur la figure IV)C.7). Cette fluorescence des feuillets élastiques est donc excitable à 860 nm et détectable au-delà de 495 nm (filtre GG495 ou HQ535/50 sur le détecteur).

Nous n'observons que très peu de signal entre les feuillets. Pourtant des cellules contenant du NAD(P)H y sont présentes (le maximum d'émission du signal de fluorescence est situé à 470 nm et on utilise un filtre passe haut au-delà de 495 nm). L'absence de signal peut provenir d'une faible densité de cellules et d'une excitation peu efficace à 860 nm du NAD(P)H (cf. figure IV)A.1, la section efficace à 860 nm est trois ordres de grandeur inférieure à sa valeur maximale à 700 nm).

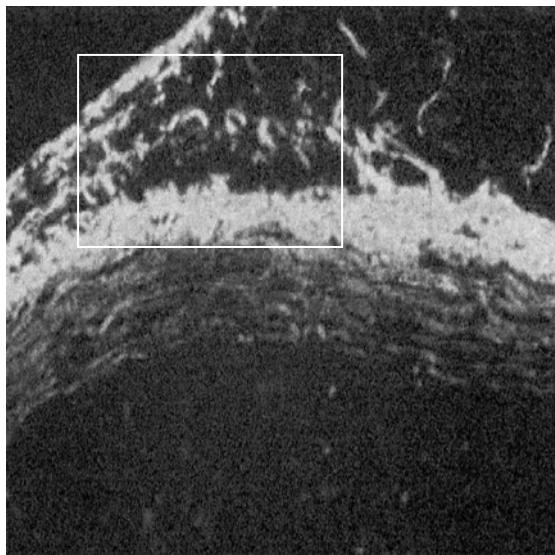
Signal de SHG : mise en évidence du collagène.

Le signal de second harmonique obtenu sur la section du tissu (ST) est localisé sur la face extérieure de l'échantillon (Figure IV)C.5). On distingue des fibres assemblées en structure dense qui correspondent à l'enveloppe de collagène entourant l'aorte. Ces structures sont en tout point comparables avec des coupes histologiques d'aortes de Rat colorées avec un colorant spécifique du collagène, le rouge Sirius.

Association des signaux de SHG et TPEF :

La figure IV)C.5 présente une projection de l'intensité moyenne de 70 images obtenues tous les  $10\mu\text{m}$  en SHG et TPEF. Elle montre que ces deux signaux permettent de visualiser la structure des artères, où les feuillets d'élastine concentriques sont entourés par des fibres de collagène (figure IV)C.2). Nos expériences montrent que la microscopie de TPEF et de SHG sont complémentaires pour l'étude des tissus vivants en profondeur.

Il est alors possible de pouvoir travailler sur un prélèvement loin des régions superficielles et de s'affranchir des artéfacts de découpe. L'image IV)C.6 montre la face découpée d'une artère carotide où l'on observe les perturbations induites par la coupe sur l'organisation des feuillets. Par exemple, sur la figure IV)C.6, les fibres de collagène ont été difficilement sectionnées. Leur séparation du tissu peut entraîner d'autres déformations notamment au niveau des feuillets d'élastine. La microscopie non linéaire est donc un mode d'imagerie plus fiable que les techniques nécessitant l'utilisation préalable d'un microtome pour effectuer des tranches de tissu inclus dans la paraffine.

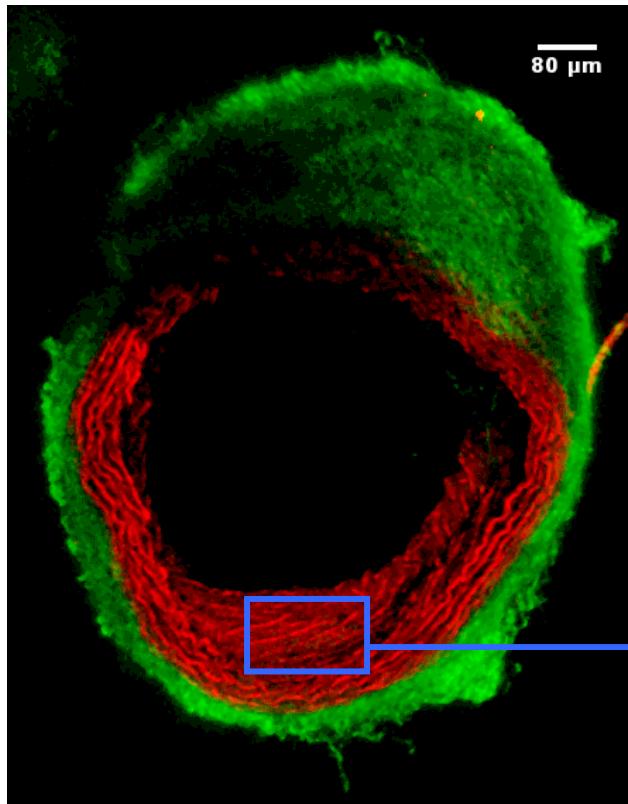


**Figure IV)C.6 :** coupe histologique d'une aorte de Rat colorée par le rouge sirius observé en microscopie en transmission. De nombreuses fibres de collagène ne sont plus liées au tissu. Objectif à air 20X O.N. : 0.5. (Pr. Godeau). Le rectangle blanc montre un accident de coupe.

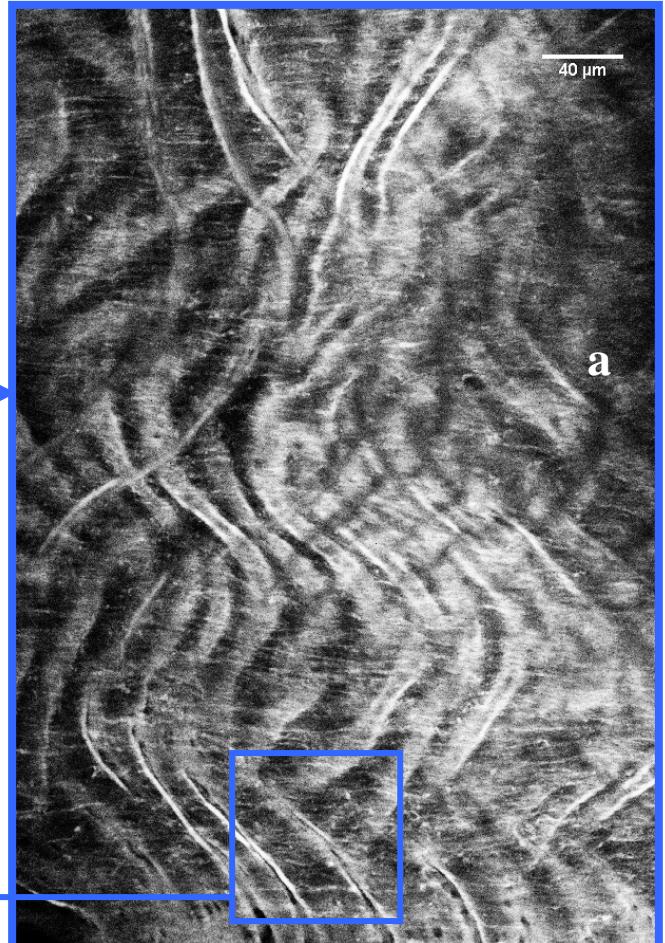
- Etudes des coupes SL :

Signal de TPEF : structure des feuillets d'élastine.

L'ouverture longitudinale d'une section d'artère permet d'accéder à l'observation de la structure des feuillets d'élastine, ce que ne permet pas l'imagerie des coupes ST. Une section SL imagée en TPEF, est présentée sur les figures IV)C.8.a et b. Elles montrent la structure des feuillets croisés qui n'est pas visible sur une coupe ST (figure IV)C.7). Cette organisation est plus clairement visible sur la figure IV)C.8.b. Une telle structure est à même d'assurer l'élasticité du tissu lorsque celui-ci est soumis aux contraintes longitudinales et transversales générées par la propagation du flux sanguin.



**Figure IV)C.7 :** Image d'une section d'artère carotide (ST) de Rat. Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 50mW. 150 plans espacés de 3µm (épaisseur 450µm), projection de l'intensité moyenne, temps par pixel : 10µs.



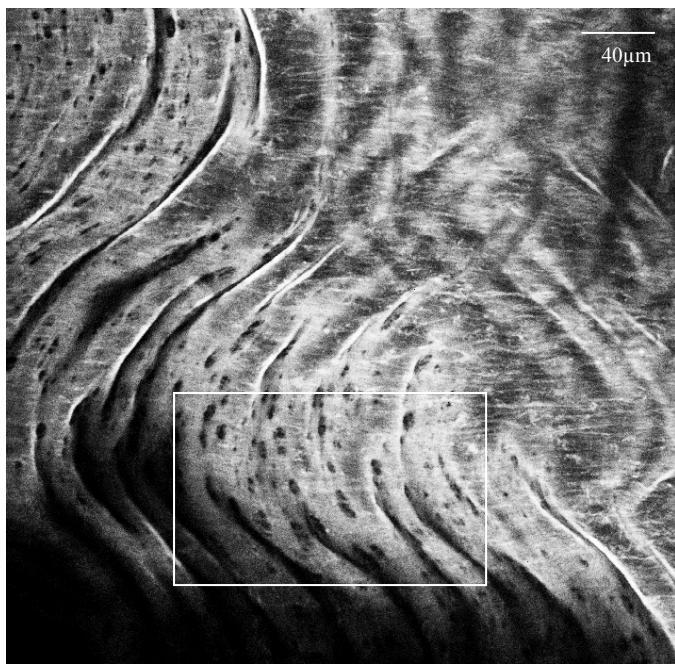
**Figure IV)C.8.a :** Image TPEF de feuillets d'élastine en assemblage croisé pour assurer les propriétés élastiques et une cohérence de l'artère carotide de Rat dans le sens de la longueur (SL).

**b :** agrandissement d'une zone mettant en évidence cette structure croisée.

Filtre GG435. Objectif 20X 0.95 à immersion dans l'eau. Excitation 860nm 25mW. Temps par pixel : 10µs.



La figure IV)C.9 montre l'existence de nombreuses ouvertures dans les feuillets d'élastine. Ces trous ont un diamètre apparent de  $4\mu\text{m}$  ( $\pm 1\mu\text{m}$ ). Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par T. Ushiki [Ushiki, 2002] en microscopie électronique à balayage qui montre également la présence de trous au niveau de l'élastine). En contrepartie d'un fort grossissement (3000), les images obtenues en microscopie électronique sont réalisées avec un champ de vue réduit. Il n'est alors pas possible d'imager une coupe ST ou SL dans son ensemble avec cette technique, ni d'étudier du tissu vivant.



**Figure IV)C.9 :** Image TPEF de feuillets d'élastine (SL) d'une artère carotide de Rat percée de nombreux trous permettant les échanges à travers l'artère avec le sang.

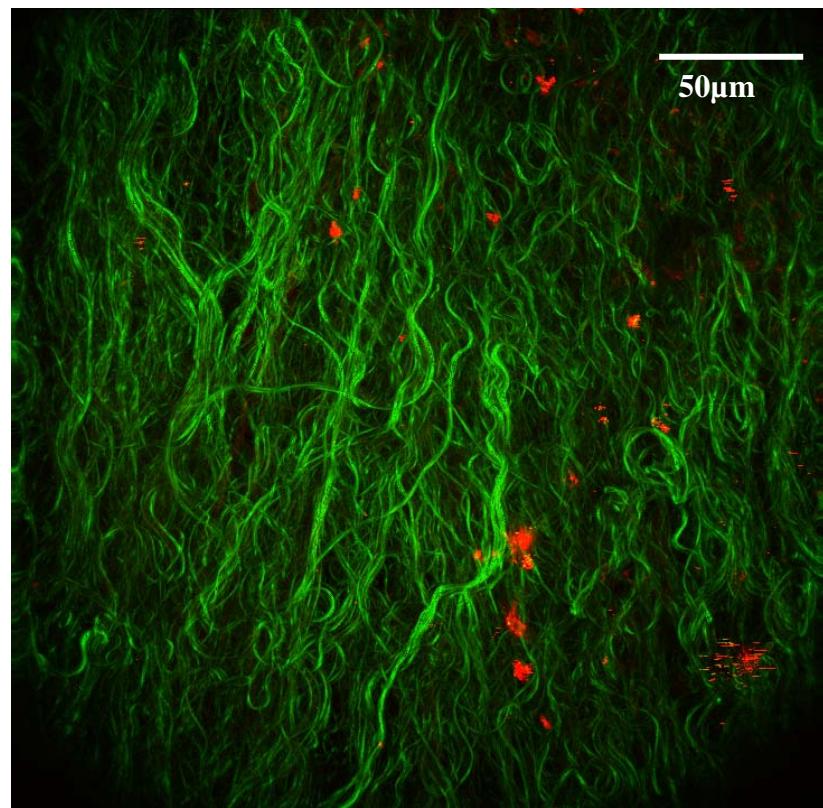
Filtre GG435. Objectif 20X 0.95 à immersion dans l'eau. Excitation 860nm 25mW. Temps par pixel : 10μs.

Signal de SHG : structure des faisceaux de collagène.

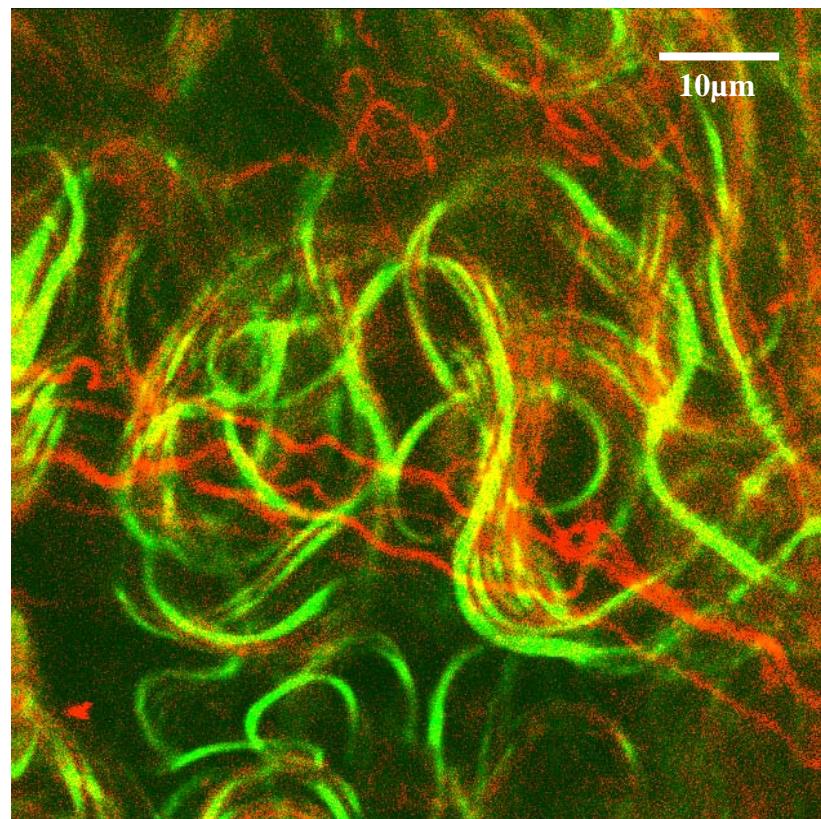
Nous présentons sur la figure IV)C.10, la partie la plus externe d'une artère, sur une coupe SL. Cette figure montre l'organisation générale des fibres de collagènes partiellement alignés. Une structuration des fibres en faisceaux de taille variable est également observée.

Association des signaux de TPEF et de SHG.

Sur une coupe SL nous nous sommes placés dans une zone située entre le collagène et l'élastine. La figure IV)C.11 montre à la fois les fibres d'élastine (TPEF) et le signal de SHG émis par les fibres de collagène. A ce grossissement, il est possible d'identifier une forme fibrillaire de l'élastine intimement imbriquée dans le collagène.



**Figure IV)C.10 :** Image d'une section d'artère carotide de Rat ouverte (SL). Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 60X à eau O.N. : 0.9, excitation 860nm 30mW. 100 plans espacés de 1µm (épaisseur 100µm), projection de l'intensité moyenne, temps par pixel : 10µs.



**Figure IV)C.11 :** Image d'une section d'artère carotide de Rat (SL). Rouge : signal TPEF de l'élastine (microfibrillles), filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 60X à eau O.N. : 0.9, excitation 860nm 30mW, temps par pixel : 10µs.

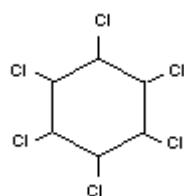
En conclusion, les techniques d'imagerie de TPEF et de SHG permettent d'accéder à la structure des fibres de collagène et des feuillets d'élastine de l'aorte et de l'artère carotide fraîchement prélevées et non colorées. Cette technique apporte par sa facilité de mise en œuvre un outil nouveau pour étudier la physio pharmacologie du tissu artériel en réponse à diverses agressions chimiques ou physiques ; nous allons étudier ici les effets du lindane.

## ii. Effets du lindane sur le système vasculaire du Rat

- Introduction :

Le lindane ( $C_6H_6Cl_6$ ) est l'isomère  $\gamma$  de l'hexachlorocyclohexane (voir figure IV)C.12). Il a été synthétisé dès 1825 par Faraday [Brooks, 1990]. Ce n'est qu'à partir de 1940 que son pouvoir insecticide a été mis en évidence. A cette époque, les soucis de santé publique liés aux pesticides n'étaient pas une priorité, seul comptait la protection des cultures contre les insectes. Le lindane constituait alors un excellent poison stomacal. Les insectes l'ingérant ou l'ingérant tremblent, perdent la coordination de leurs mouvements, finissent paralysés. Le lindane s'attaque au système nerveux central, mais son mode d'action est encore mal établi. Utilisé une cinquantaine d'années à travers le monde comme insecticide, le lindane entrait également dans la composition de shampooings destinés à lutter contre les poux et la gale [Sauviat, 2002a].

La durée de vie du lindane est importante et il se répartit dans toute la chaîne alimentaire.



**Figure IV)C.12 :** formule semi développée du lindane.

- Toxicité directe :

Les effets directs d'une ingestion de lindane se font ressentir au niveau du système nerveux central chez l'Homme. Il entraîne des convulsions accompagnées de diarrhées et de vomissements. Les conséquences d'une application cutanée ou d'une très faible ingestion du produit sont des nausées, des migraines, des vertiges et une faiblesse musculaire [Harris, 1992].

Il a été montré que le lindane ingéré à raison de 88mg par kilogramme de masse corporelle tue 50% d'une population de Rats. Chez l'homme, une ingestion de 62,5mg/kg, s'est révélée létale chez une personne « fragile ». Certains volontaires ont ingéré une quantité de 17mg/kg et ont ressenti des symptômes très sévères. La dose létale pour un adulte est estimée entre 0,8 et 1,7g/kg [Brooks, 1990], [Ware, 1988].

- Exposition :

L'autorité internationale, *Codex Alimentarius*, a fixé à 0,008mg par kilogramme de masse corporelle la dose journalière maximale de lindane pouvant être ingérée. L'Europe était l'endroit où la quantité ingérée était la plus grande, elle atteignait 0,012mg/kg. Cette ingestion provenait surtout de la consommation de tomates, céréales, viande rouge et de lait. [*Codex Alimentarius*, 1998].

- Effets à long terme :

A ce jour, malgré un nombre conséquent de travaux, la disparition de plaquettes sanguines et des globules blancs liée au lindane n'a pas pu être mise en évidence clairement [Moses, 1993]. Certaines études ont tenté de montrer que de nombreuses malformations congénitales sont induites par le lindane lors des premiers mois de grossesse, mais la plupart des patientes ont été exposées en même temps à d'autres toxiques. Il est donc difficile d'isoler l'effet individuel du lindane dans ces populations.

Le lindane est aussi suspecté d'entraîner des cancers du sein. Dans la ville de Lincolnshire en Angleterre, où il a été fait une utilisation massive de lindane pour les cultures de betteraves à sucre, le nombre de cancer du sein est 40% plus élevé que la moyenne anglaise [Moses, 1993].

Le lindane est un disrupteur hormonal dont les effets se font ressentir au niveau de différents tissus [Pages, 2002]. Le lindane perturbe le fonctionnement du système cardio-circulatoire [Sauviat, 2002a].

Des études électrophysiologiques ont montré que le lindane affecte l'activité des cellules cardiaques dont il active le courant potassique rapide [Sauviat, 2002b].

Chez le Rat l'ingestion chronique de doses résiduelles de lindane affecte la réponse électrique du muscle papillaire isolé du ventricule gauche et induit des altérations morphologiques du tissu cardiaque. Ces observations ont conduit à développer une étude concernant les altérations possibles induites par le lindane sur la descendance.

Dans le cadre de ces études sur les effets cardiovasculaires induits par le lindane chez le Rat, nous avons analysé la morphologie et les modifications du tissu artériel :

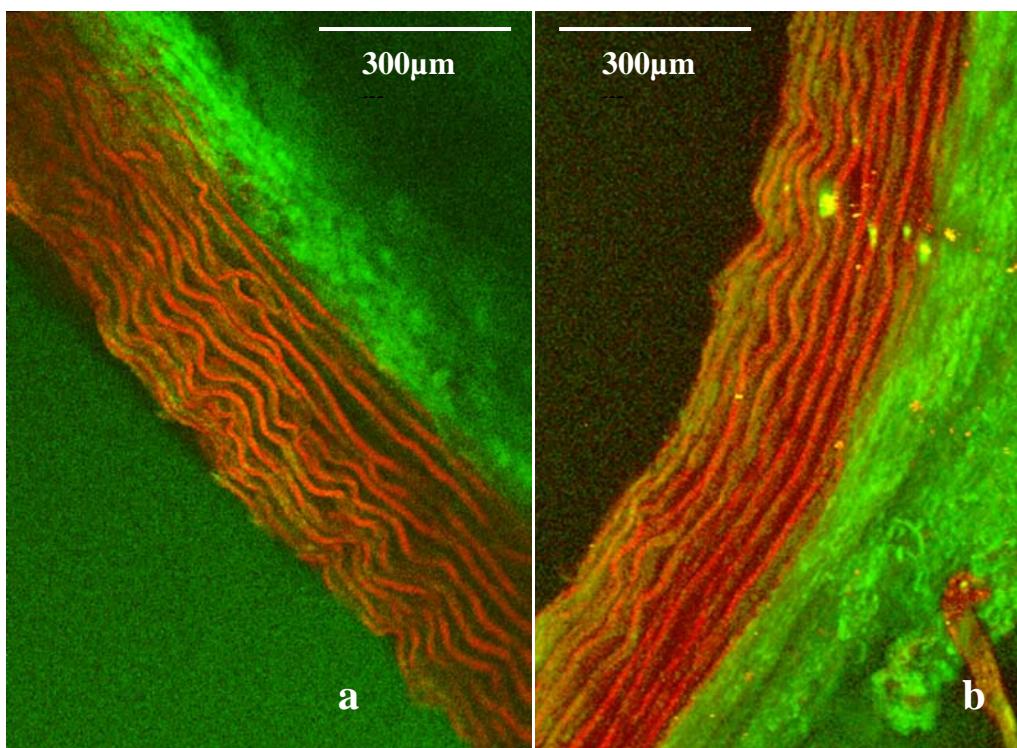
- Lors d'une application directe de lindane.
- Chez des Rats ayant ingérés des doses résiduelles de lindane.
- Chez des Rats n'ayant pas reçu de lindane, mais descendant d'un père ayant ingéré du lindane.

Notre étude a porté sur 12 contrôles (11 âgés de 3mois et 1 de 12mois), 6 Rats non traités de père traité âgés de 3 mois, 2 pères traités âgés de 12mois (collaboration avec le Pr. Pages, Laboratoire de Toxinologie, Université Louis Pasteur, Strasbourg). Pour chaque animal étudié plusieurs prélèvements d'aorte et d'artère carotide interne ont été réalisés puis imagés. Nous ne présentons que les images significatives de déformations rencontrées systématiquement pour une même population.

- Effets d'une application directe de lindane sur le tissu artériel :

Nous avons testé l'effet de l'addition de lindane ( $17\mu\text{mol/L}$ ) au milieu physiologique. Cette concentration provoque une réduction notable de la durée du potentiel d'action du muscle papillaire isolé du ventricule gauche du coeur de Rat.

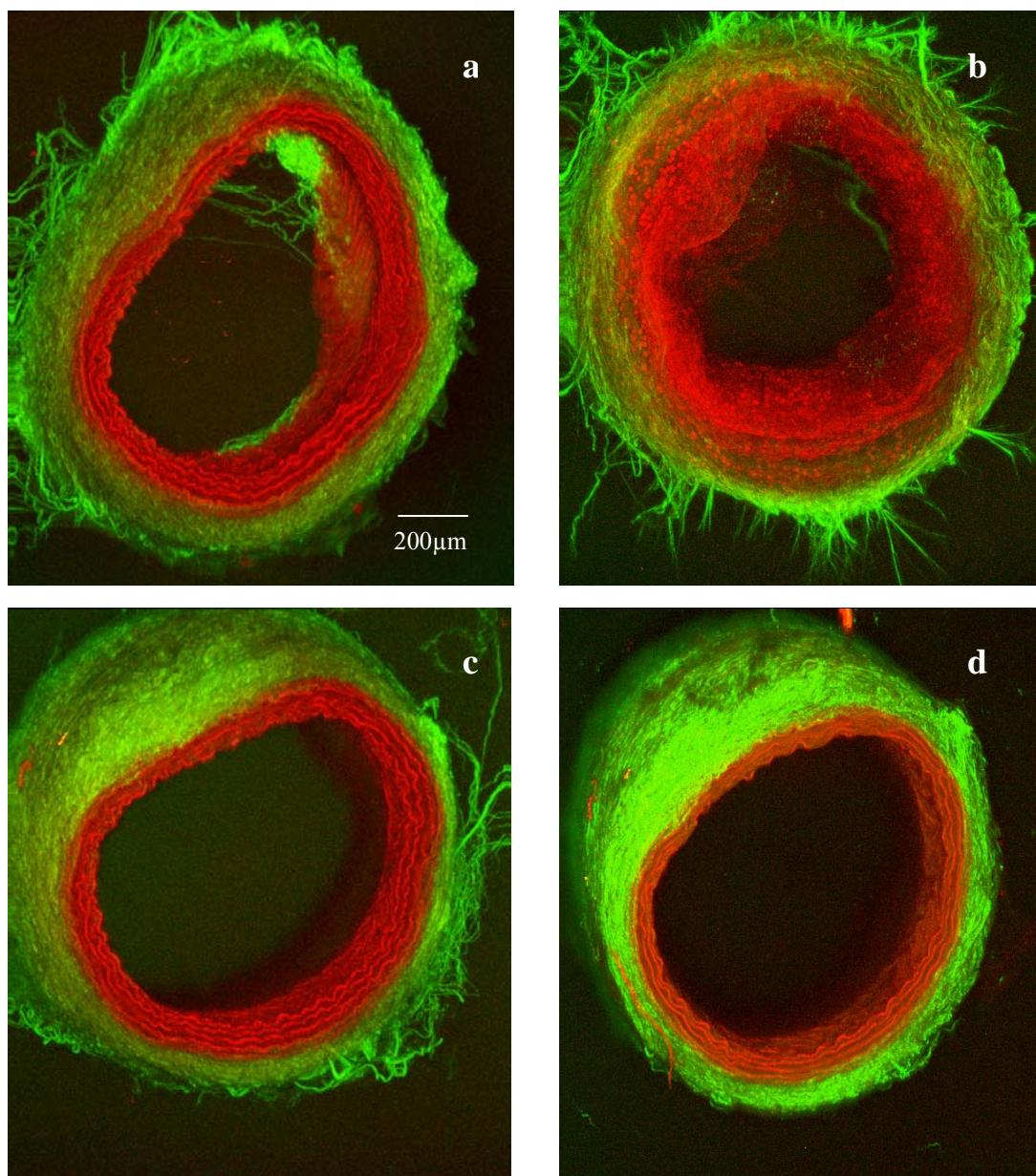
L'addition de lindane au milieu de Tyrode n'induit pas de modifications apparentes de l'organisation des feuillets d'élastine et du collagène du tissu aortique (figure IV)C.13.b). Après 24h d'exposition la comparaison avec du tissu contrôle (figure IV)C.13.a) ne montre pas de différences significatives.



**Figure IV)C.13** ST d'une aorte de Rat contrôle, **a** : en l'absence de lindane et **b** : 24h après exposition de Tyrode contenant du lindane ( $17\mu\text{mol/L}$ ).  
Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma.  
Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 20mW. Taux par pixel : 100kHz.

La figure IV)C.14.b montre que le tissu aortique conservé dans le milieu de Tyrode (3jours à 30°C) subit une dégradation des feuillets d'élastine ainsi qu'une désorganisation des fibres collagéniques. En présence de lindane ( $17\mu\text{mol/L}$ ) dans le milieu, la dégradation des feuillets d'élastine et les déformations des faisceaux de collagène apparaissent moins marquées (figure IV)C.15.b).

Ces observations suggèrent que le lindane exerce un effet protecteur sur le tissu artériel. La dégradation des tissus est attribuée à la présence d'enzymes (élastases, et métalloprotéases) et de bactéries.



**Figure IV)C.15 :** coupes (ST) de carotide issue de Rat, **a** :au temps initial dans une solution de Tyrode, **b** : après 3jours à 30°C en l'absence de lindane,( la dégradation du collagène et des feuillets est évidente), **c** : au temps initial dans une solution de Tyrode contenant  $17\mu\text{mol/L}$  de lindane, **d** : après 3jours à 30°C avec  $17\mu\text{mol/L}$  de lindane. Noter le resserrement des feuillets d'élastine et une vasodilatation apparente. Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10Xà air O.N. : 0.3, excitation 860nm 30mW. Temps par pixel : 10μs. 60 plans espacés de 5μm (épaisseur 300μm), projection de l'intensité moyenne.

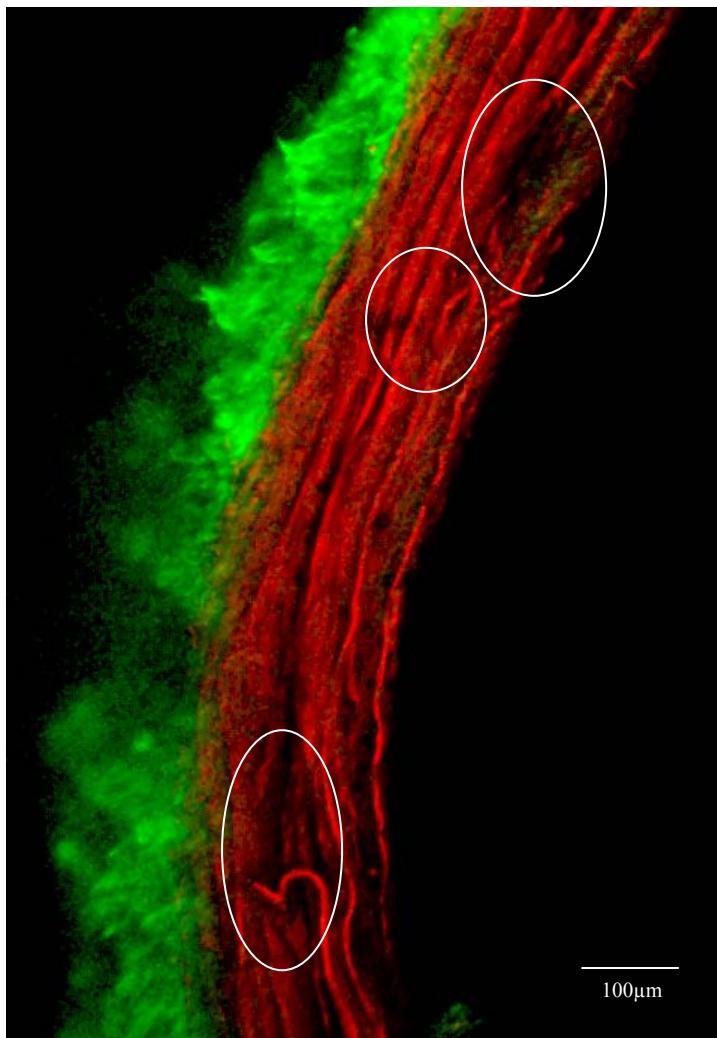
- Tissu artériel de Rat ayant ingéré du lindane :

Nous avons étudié le tissu artériel de Rats mâles ayant ingéré du lindane *in utero* durant la gestation et jusqu'à l'âge de 12 mois, provenant de mère ayant préalablement ingéré une dose résiduelle de lindane (2ppb) dans les mêmes conditions.

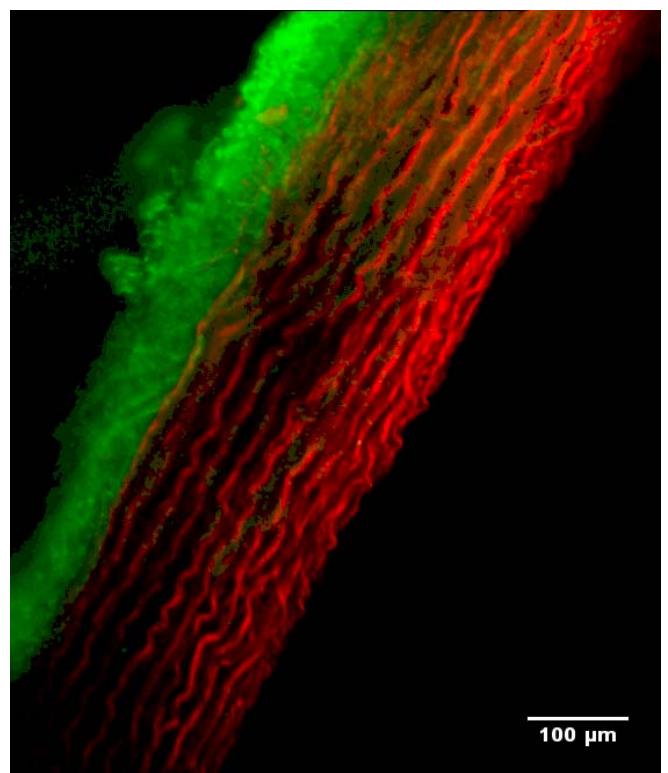
Le tissu aortique de ces animaux était anormalement souple, l'observation de coupes ST en TPEF et SHG montre que les feuillets d'élastine sont plus distants, moins régulièrement espacés et sectionnés chez les Rats traités (figure IV)C.16) que chez les Rats non traités (figure IV)C.17). Cette destruction apparente de l'élastine peut rendre compte de l'absence d'élasticité rencontrée lors de la dissection.

La couche externe de collagène semble perturbée ainsi que le montre la comparaison des figures IV)C.16 et 17.

L'ensemble de ces altérations peut rendre compte de la plus grande souplesse de l'aorte observée.



**Figure IV)C.16 :** SC d'une aorte de Rat (âgé d'1an) traité au lindane (dose résiduelle de 2ppb durant sa vie et la période de gestation). Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 20mW. 24 plans espacés de 2μm (épaisseur 58μm), projection de l'intensité moyenne, temps par pixel : 10μs. Noter les anomalies des feuillets d'élastine (rupture et lacunes, cercles blancs) et les altérations du collagène. Les feuillets ne sont pas régulièrement espacés.



**Figure IV)C.17 :** SC d'une aorte d'un rat témoin (âgé d'1an). Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 20mW. 30 plans espacés de 3μm (épaisseur 90μm), projection de l'intensité moyenne, temps par pixel : 10μs.

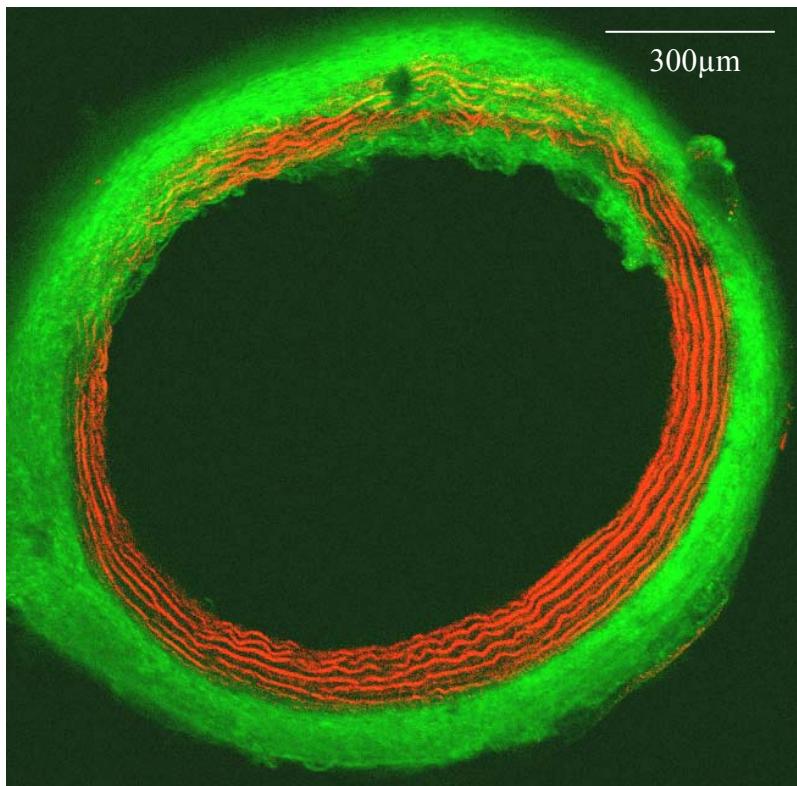
- Effets induits chez les Rats descendant de père ayant reçu du lindane :

Nous avons imaginé l'aorte et l'artère carotide interne de Rats issues d'un père ayant reçu du lindane (cf. point précédent) dans l'eau de boisson (2ppb), et d'une mère n'ayant jamais ingéré de pesticide.

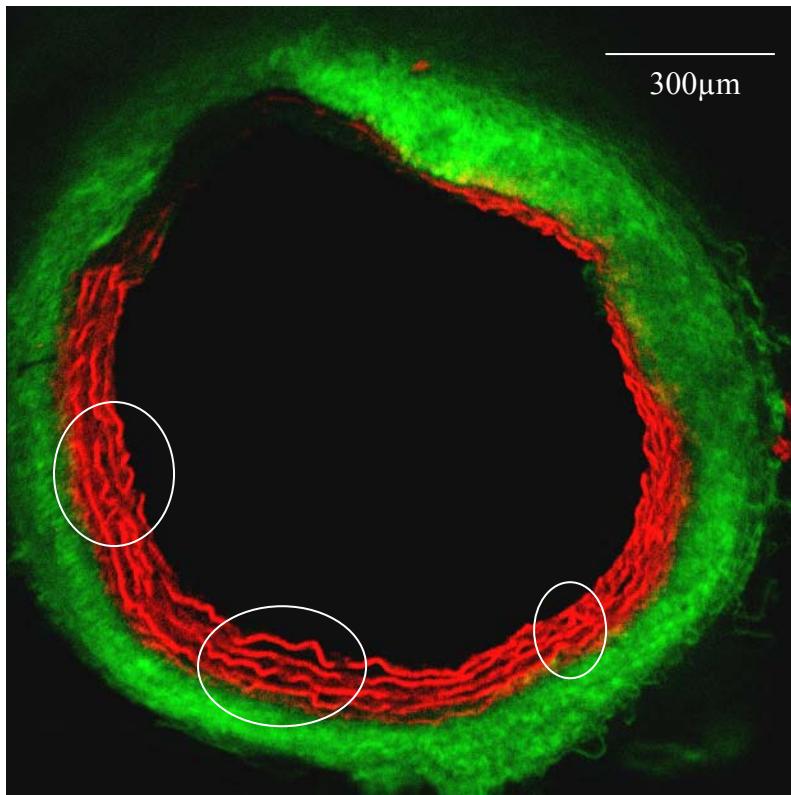
La figure IV)C.18 présente un échantillon ST provenant de l'artère carotide d'un Rat mâle témoin. Les figures IV)C.19 et IV)C.20 présentent les images d'un échantillon de l'artère carotide provenant de Rats descendants d'un père traité. Nous observons que les feuillets d'élastine sont irrégulièrement espacés et présentent des ondulations (figure IV)C.19 et 20) qui sont absentes chez le témoin.

Nous ne remarquons cependant pas de différence au niveau du collagène.

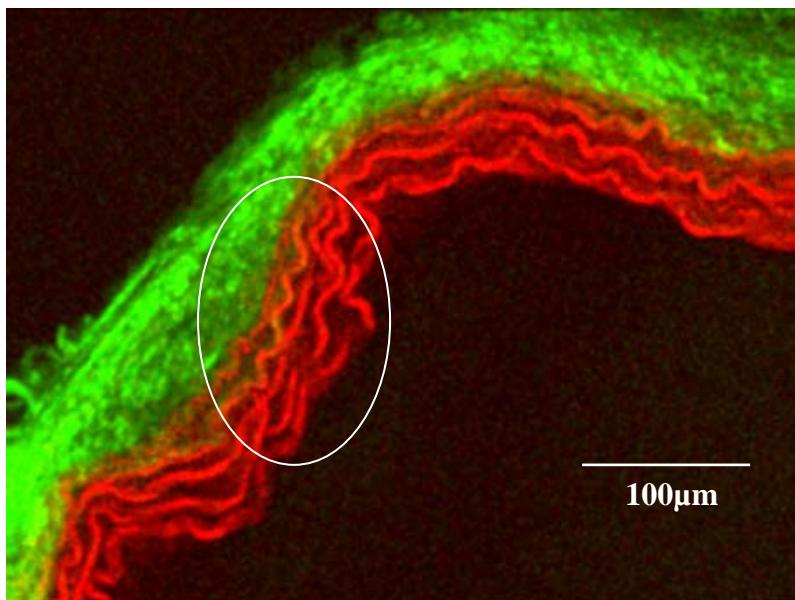
Les figures IV)C.21 et 22 montrent respectivement des coupes ST d'aortes d'animaux témoin et descendant de père traité. Les feuillets d'élastine sont particulièrement ondulés et sectionnés (figure IV)C.22) chez les descendants par comparaison avec l'aorte des témoins (figure IV)C.21).



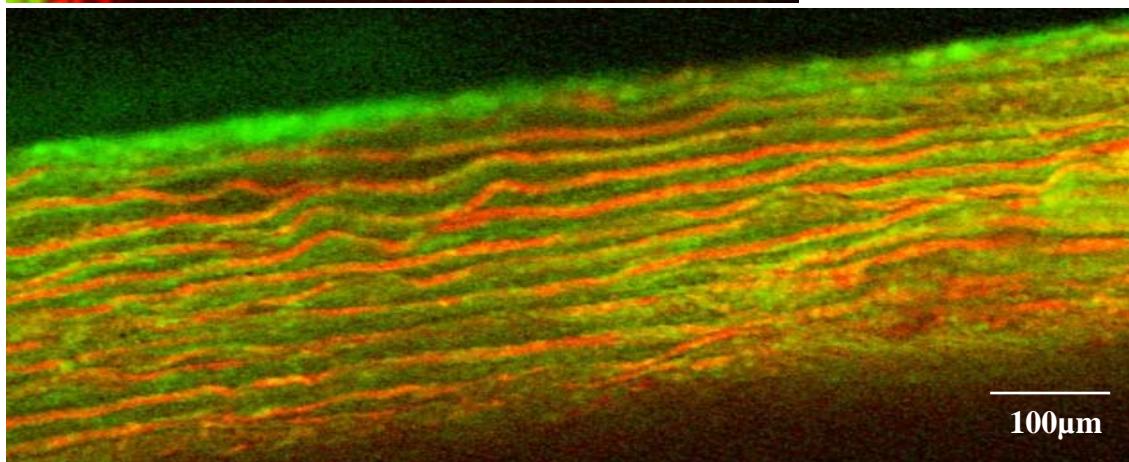
**Figure IV)C.18 :** SC d'une carotide d'un rat témoin. Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 60mW. 40 plans espacés de 10μm (épaisseur 400μm), projection de l'intensité moyenne, temps par pixel : 10μs.



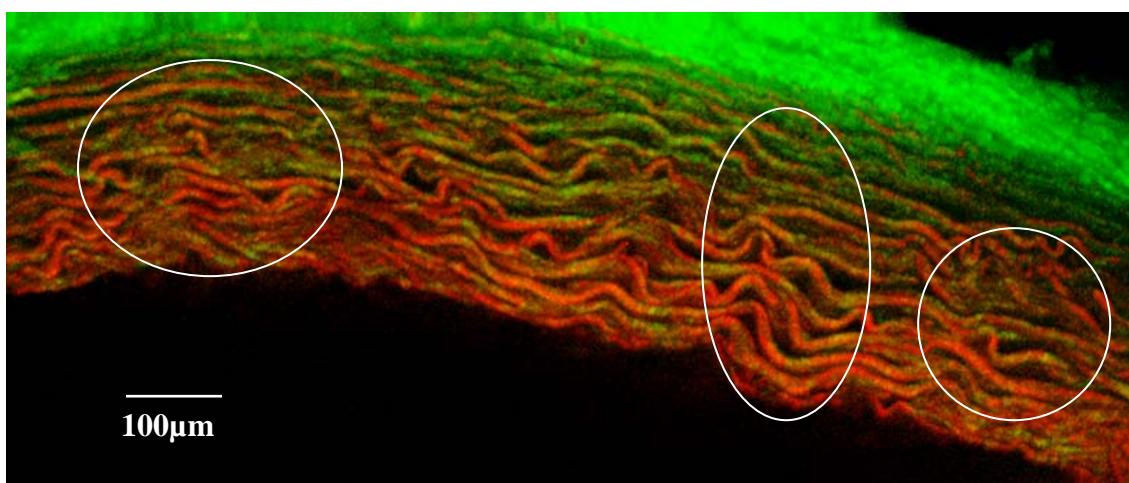
**Figure IV)C.19 :** SC d'une carotide d'un Rat descendant d'un père traité au lindane. Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 30mW. 65 plans espacés de 3μm (épaisseur 195μm), projection de l'intensité moyenne, temps par pixel : 10μs. Les cercles blancs désignent certaines lacunes et des feuillets sectionnés. Les feuillets ne sont pas régulièrement espacés.



**Figure IV)C.20 :** SC d'une carotide d'un rat non traité descendant d'un père traité au lindane. Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 30mW. Temps par pixel : 10μs.



**Figure IV)C.21 :** SC d'une aorte d'un Rat témoin. Rouge : signal TPEF de l'élastine, filtre GG435. Vert : SHG collagène filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 20mW. Temps par pixel : 10μs.



**Figure IV)C.22 :** SC d'une aorte d'un Rat descendant de père traité. Rouge : signal TPEF filtre GG435. Vert : SHG filtre HQ430/20Chroma. Objectif 10X Zeiss Neofluar à air O.N. : 0.3, excitation 860nm 30mW. 200 plans espacés de 3μm (épaisseur 600μm), projection de l'intensité moyenne. Temps par pixel : 10μs.

## Conclusion :

Nos résultats montrent que l'imagerie non linéaire combinée de TPEF et de SHG permet une observation directe et précise du tissu artériel vivant, sans nécessiter de coloration.

Ils montrent que l'élastine est une des cibles du lindane lorsque celui-ci est ingéré directement. Nos résultats ouvrent la voie à une recherche plus approfondie sur les modifications induites par ce pesticide sur le système cardio-vasculaire. Ils montrent aussi que le lindane peut générer des altérations génétiques qui affectent la structure des feuillets d'élastine chez les descendants.

De telles altérations du tissu artériel sont à même de faciliter les accidents vasculaires, et de conduire à des anévrismes. Cette étude permet de préciser les modifications induites par le lindane sur le système cardio-circulatoire en s'affranchissant de nombreux problèmes expérimentaux rencontrés en histologie classique. La facilité de mise en œuvre de cette technique démontre que la microscopie non linéaire est particulièrement adaptée pour l'étude pharmacologique et morphologique des tissus épais vivants.



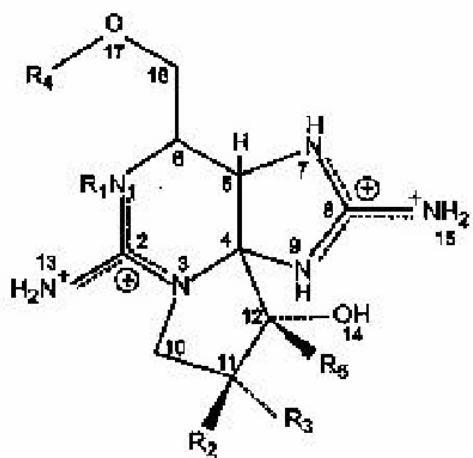
## IV) D. Effet de la saxitoxine sur les cellules cardiaques

### i. Motivations

- La saxitoxine :

La saxitoxine (Fig IV)D.1) est une toxine naturelle sécrétée par les dinophycées. Les dinophycées sont des organismes végétaux aquatiques unicellulaires, caractérisés par deux flagelles ventrales. Ils se retrouvent aussi bien en eau douce qu'en milieu marin (lagunes, marais salants, océan indien, mer rouge). Dans certaines conditions, certaines espèces pullulent, on peut en dénombrer jusqu'à un million par litre. Cette densité importante peut contribuer à une coloration rouge de l'eau (*marées rouges*). La saxitoxine peut provoquer une mortalité considérable de certains animaux et du plancton. Elle est très dangereuse pour l'homme lorsque celui-ci consomme des coquillages ou du poisson provenant de zones contaminées [Kvitek, 1991].

La saxitoxine (STX) est une toxine paralysante, elle agit sur les canaux sodiques sensibles au potentiel. Elle bloque la propagation de l'influx nerveux et provoque ainsi la paralysie. Les victimes ressentent tout d'abord des picotements et un engourdissement au niveau de la bouche, de la langue et du visage. Dans le cas d'un empoisonnement important, il existe des symptômes d'ataxie (perturbation de la motricité), de faiblesse musculaire et de vertiges. Le diaphragme cesse de fonctionner dans les cas mortels [Robillot, 2002].



**Figure IV)D.1 :** Structure générale des toxines paralysantes, pour la saxitoxine,  $R_1 : H$ ,  $R_2 : H$ ,  $R_3 : H$ ,  $R_4 : CONH_2$ ,  $R_5 : O$ .

- Etude en microscopie non linéaire :

Des cellules atriales de grenouilles ont été étudiées par le groupe de M-P. Sauviat au Laboratoire d'Optique et Biosciences en électrophysiologie. Ces études ont pour objectif de rendre compte des perturbations induites par la STX sur les cellules excitables. Des perturbations sur le courant transmembranaire d'origine sodique a été mis en évidence et [Narahashi, 2000].

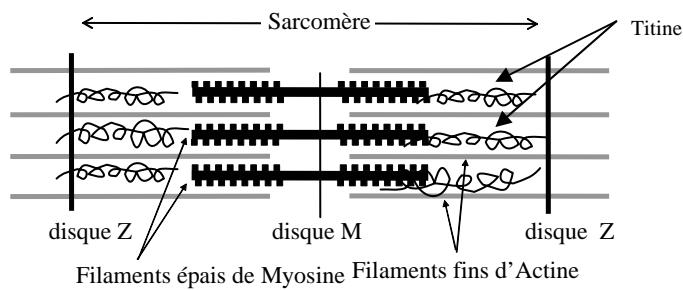
Le complexe actine-myosine, étudié notamment dans le muscle squelettique [Campagnola, 2002], [Guo, 1997] a été identifié comme un générateur de second harmonique très efficace. Il est donc probable que cette source de contraste nous permette d'imager un autre type de muscle : le muscle cardiaque.

Ces cellules étant difficilement observables en microscopie classique, nous pensons que l'imagerie non linéaire permettra de corrélérer les résultats électrophysiologiques avec des modifications morphologiques des cellules.

- Structure :

Le sarcomère (figure IV)D.2) est l'unité contractile élémentaire des myocytes cardiaques ( $300\text{-}500\mu\text{m} \times 3\text{-}5\mu\text{m}$ ) et du muscle squelettique. Il existe deux types de filaments présents dans les myocytes : les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine. Des têtes globulaires sont présentes aux extrémités des filaments épais de myosine. Les filaments de myosine sont en interaction avec les filaments fins d'actine par ces têtes globulaires. Les filaments d'actine sont reliés aux disques Z. C'est entre deux disques Z que l'on délimite un sarcomère. Les filaments de myosine sont également liés aux disques Z par l'intermédiaire d'une protéine qui agit comme un ressort passif : la titine (protéine géante de 3000kDa environ). La titine est élastique et possède une taille variable qui s'ajuste en fonction de l'état de contraction de la cellule. Elle est insérée dans les filaments épais [Clark, 2002], [Trinick, 1999], [Sanger, 2001].

La contraction se fait par un déplacement des têtes globulaires présentes aux extrémités des filaments de myosine le long des filaments d'actine. Une consommation d'ATP est nécessaire pour assurer le déplacement des têtes le long de l'actine. La zone centrale de la myosine est appelée disque M.



**Figure IV)D.2 :** représentation schématique d'un sarcomère

Les cellules peuvent être observées directement après leur prélèvement. Ces cellules étant assez fragiles, le gain de temps du fait de la non coloration est un avantage essentiel. De plus, l'étape de coloration nécessite toujours une étape de rinçage, généralement fragilisante pour les cellules.

Ceci nous permet de mesurer les variations morphologiques induites par la STX et invisibles en microscopie classique.

## ii. Expériences réalisées

- Prélèvements :

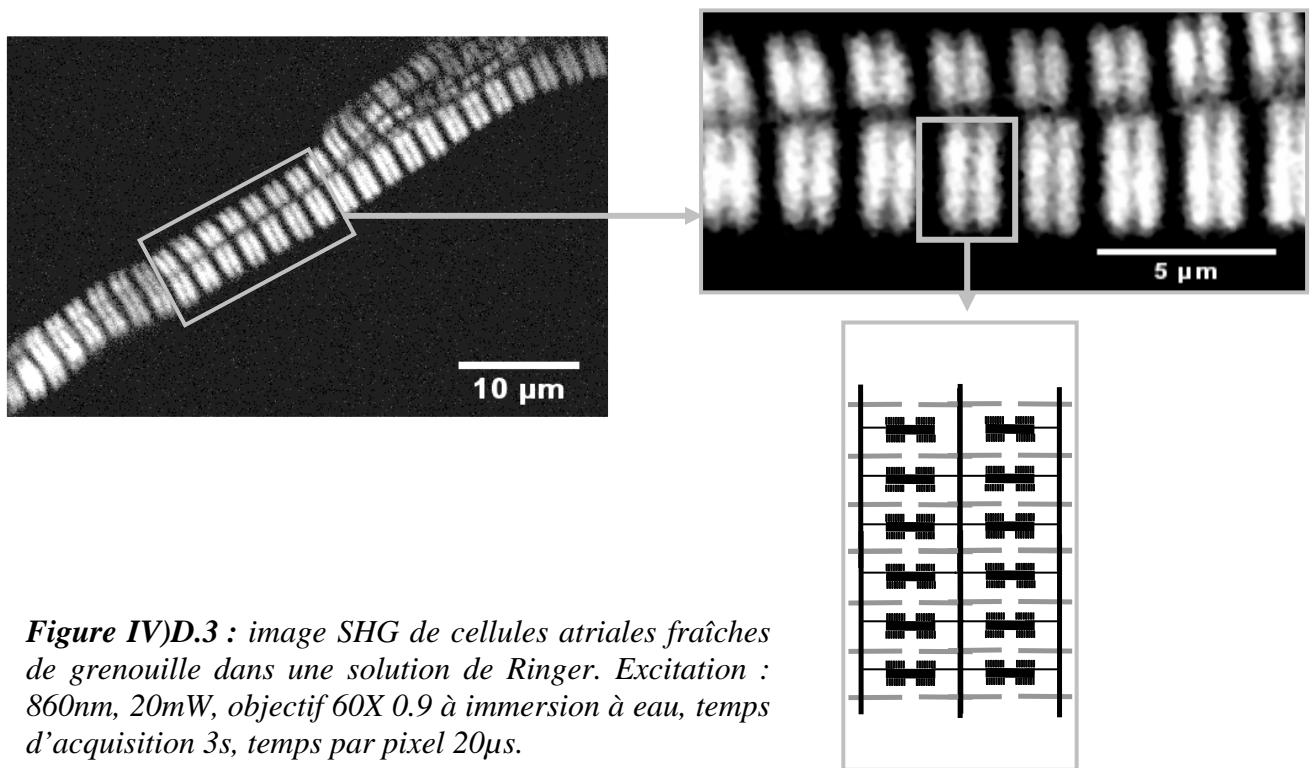
Les myocytes sont obtenus par digestion enzymatique de la région sino-atriale d'un cœur de grenouille adulte. Ils sont placés dans des boîtes de Pétri en plastique (dimensions : 10X35mm) contenant une solution de Ringer. La composition du milieu de Ringer est en mmol/L : NaCl: 110.5; KCl: 2.5; CaCl<sub>2</sub>: 2; MgCl<sub>2</sub>: 1; Na pyruvate: 5; HEPES (NaOH): 10; glucose(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) : 10; albumine : 1 mg/mL; pH = 7.35. Le milieu de Ringer est un tampon acido-basique dont la composition ionique et le pH sont voisins de ceux du sang de la grenouille afin de limiter tout phénomène osmotique qui perturberait la morphologie des cellules.

- Paramètres retenus :

Les cellules étant contenues dans un milieu aqueux de Ringer, il est possible d'utiliser un objectif à immersion à eau. Nous avons utilisé un objectif 60X d'ouverture 0.9, qui procure un champ spatial (300 $\mu\text{m}$ ) suffisant pour observer les cellules. Une longueur d'onde d'excitation de 860nm a été choisie, avec une puissance moyenne au niveau du foyer de l'objectif de 20mW. Cette puissance ne cause aucun dommage morphologique visible à l'échantillon. Une telle illumination répétée plusieurs fois (entre 5 et 10) ne modifient pas l'intensité du signal de SHG détecté et nous ne voyons apparaître aucun signal de fluorescence.

Le signal de SHG est détecté en transmission sur le microscope à travers un filtre E700SP (filtrant le faisceau fondamental) et un filtre interférentiel HQ430/20 fabriqué par Chroma. Le signal détecté est typiquement de 2500 photons (vers 430nm) par milliseconde pour 25mW d'excitation, petit devant le seuil de saturation de la détection. Nous n'avons pas mesuré de signal de TPEF significatif dans ces expériences.

Une image typique obtenue est présentée à la figure IV)D.3. Nous identifions les zones lumineuses comme correspondant aux têtes de myosine. Cette identification est compatible avec les travaux de Both et Campagnola [Both, 2003], [Campagnola, 2002] où l'origine du signal est située globalement au niveau du complexe acto-myosine. On distingue la zone autour du disque M entre les têtes et la zone autour du disque Z délimitant un sarcomère.



**Figure IV)D.3 :** image SHG de cellules atriales fraîches de grenouille dans une solution de Ringer. Excitation : 860nm, 20mW, objectif 60X 0.9 à immersion à eau, temps d'acquisition 3s, temps par pixel 20μs.

- Protocole expérimental :

Nous avons extrait pour chaque image le profil en intensité sur une ligne tracé le long d'une cellule. Ceci nous limite à des portions approximativement rectilignes de cellule. Le profil en intensité mesuré sur une cellule ne doit pas présenter de variations spatiales sur une distance comparable à celle séparant deux sarcomères.

L'évolution spatiale du signal de SHG provenant des cellules peut être très bien représentée par une somme de gaussiennes décalées dans l'espace.

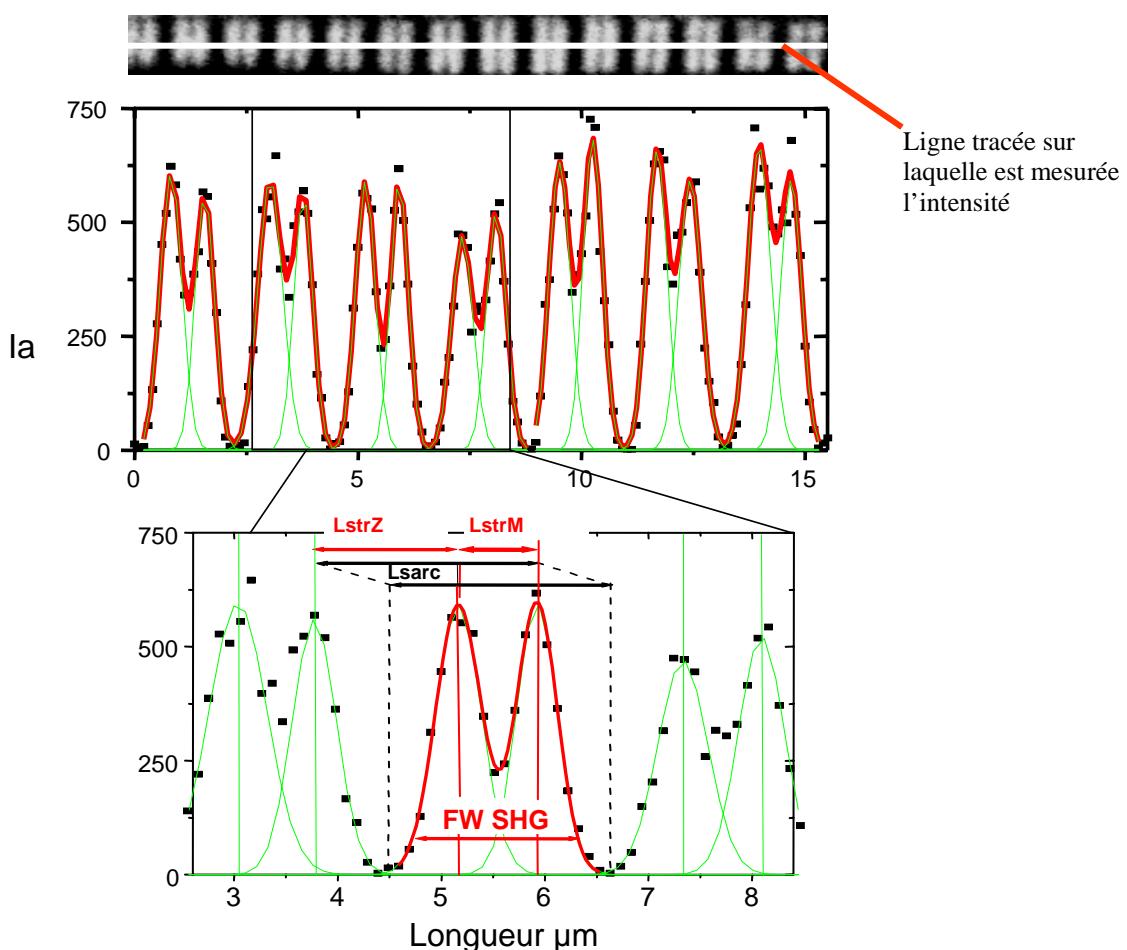
La distance séparant deux zones lumineuses (largeur autour du disque M) est supérieure à la résolution de l'objectif employé (400nm). En procédant à un ajustement du profil d'intensité mesurée, il est alors possible de repérer la position des 2 maxima dans un sarcomère avec une résolution meilleure que celle de l'objectif. L'incertitude sur la détermination de la position du maximum possède deux origines. La première est liée à la méthode de recherche du meilleur ajustement des point expérimentaux et la seconde dépend de la dispersion des mesures sur différents échantillons. Les ajustements obtenus à partir des images permettent une détermination précise des distances à 15nm près. La précision est meilleure que la résolution latérale de l'objectif utilisé qui est de 400nm.

Les mesures suivantes sont effectuées (cf figure IV)D.4) :

- La longueur autour du disque M (LstrM), comprise entre les milieux de deux pics en intensité du signal de SHG d'un même sarcomère.
- La longueur autour du disque Z (LstrZ), mesurée entre les centres de deux pics consécutifs les plus distants possible appartenant à deux sarcomères différents.
- La largeur à  $1/e^2$  de l'intensité de SHG globale dans un sarcomère (FW-SHG), obtenue par l'addition de la longueur autour du disque M et des demi largeurs à  $1/e^2$  de deux pics plus proches voisins d'un même sarcomère.

- La longueur d'un sarcomère (Lsarc) mesurée tous les deux pics de SHG.

Ce travail a été effectué sur de nombreuses cellules, et les mesures effectuées sont ensuite comparées entre elles. La dispersion des mesures autour des différentes moyennes obtenues nous conduit finalement à une précision de 20nm sur les mesures. Notons que si nous avions pris en compte des images comportant un faisceau très dense de plusieurs cellules ou des cellules non contenues dans le plan focal, la dispersion des mesures augmente. La précision dans la détermination des longueurs est fortement dégradée.



**Figure IV)D.4 :** procédure de détermination des distances caractéristiques dans une cellule LstrZ, LstrM, FW SHG et Lsarc. Le profil d'intensité obtenu sur la ligne tracée en blanc sur l'image est ajusté par une somme de fonctions gaussiennes.

### iii. Résultats

Nous avons étudié de nombreuses cellules provenant de grenouilles différentes. Afin d'étudier l'effet de la STX, nous avons utilisé plusieurs cellules provenant de la même grenouille pour assurer une comparaison fiable.

4 solutions différentes sont utilisées. La première ne contient que du milieu de Ringer et servira de témoin. La seconde contient en plus de la STX à la concentration de 8nmol/L. La troisième contient un anticontracturant le BDM (butanedionemonoxime C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> bloquant les canaux K<sup>+</sup> dépendant de l'ATP, et inhibiteur de la phosphorylation de la myosine), la dernière contient du BDM et de la STX à la concentration de 8nmol/L. Les cellules sont directement placées dans ces solutions. Le BDM est opposé à l'effet contracturant de la STX. Les observations sont réalisées 30min après l'introduction des produits.

Les images sont réalisées sur des cellules ne possédant pas de courbures trop grandes car celles-ci correspondent à des altérations cellulaires.

- Contraction sous l'effet de la STX :

Comme le montre le tableau IV)D.1, on remarque que la taille moyenne d'un sarcomère varie de 2,31μm+/-0,02μm dans le cas du contrôle à 2,14μm+/-0,02μm en présence de STX (8nmol/L), soit une variation comprise entre 6 et 10%. La saxitoxine provoque donc la contracture des cellules atriales de cœur de grenouille.

	Nombre de myocytes/ sarcomères	LstrM (μm)	LstrZ (μm)	FW-SHG (μm)	Lsar (μm)
Contrôle	6/60	0,80 ±0,02	1,51 ±0,02	1,79 ± 0,02	2,31 ± 0,02
STX(8nM)	10/52	0,75 ±0,02	1,39 ±0,02	1,82 ± 0,02	2,14± 0,02

**Tableau IV)D.1** : résultats des moyennes pondérées des différentes mesures effectués sur les ajustements obtenus à partir des images.

- Action du BDM et de la STX :

Les cellules sont placées en présence de l'anticontracturant BDM, bloquant le déplacement des têtes myosines le long des filaments d'actine, par inhibition de la phosphorylation de l'ATP. Les mesures sont présentées dans le tableau IV)D.2. Une autre solution contient en plus de la STX. Le BDM induit une légère contracture du sarcomère ( $2,25\mu\text{m}$ ) par rapport au contrôle ( $2,31\mu\text{m}$ ). La STX en présence de BDM ne modifie pas la taille du sarcomère qui reste identique ( $2,24\mu\text{m}$ ). La STX en l'absence de BDM provoquant une contracture, cette contracture est donc bien due à un déplacement des têtes de myosine le long de l'actine, les déformations observées ne sont donc pas d'origine osmotique.

	Nombre de myocytes/ sarcomeres	LstrM ( $\mu\text{m}$ )	LstrZ ( $\mu\text{m}$ )	FW-SHG ( $\mu\text{m}$ )	Lsarc ( $\mu\text{m}$ )
Contrôle	6/60	$0,80 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,02$	$1,79 \pm 0,02$	$2,31 \pm 0,02$
BDM( $1\mu\text{M}$ )	6/33	$0,78 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,02$	$1,82 \pm 0,02$	$2,25 \pm 0,02$
BDM+STX ( $1\mu\text{M}$ )+( $8\text{nM}$ )	8/41	$0,77 \pm 0,02$	$1,48 \pm 0,02$	$1,68 \pm 0,02$	$2,24 \pm 0,02$

**Tableau IV)D.2 :** résultats des moyennes pondérées des différentes mesures effectuées sur les ajustements obtenus à partir des images.

- Origine du signal :

Une hypothèse possible est que le signal de SHG provient de la zone de recouvrement entre l'actine et la myosine. Dans ce cas, lors de la contracture sous l'effet de la STX, ce recouvrement est plus grand entre les filaments épais et ceux d'actine, on devrait alors assister à une réduction de la largeur de la LstrM (dans le cas d'un recouvrement incomplet entre les filaments et les têtes de myosine lorsque la cellule est au repos). Cette diminution devrait être comparable à la variation de la longueur du sarcomère. Or, nos expériences contredisent cette hypothèse, la variation de Lsarc est de 170nm entre le contrôle et en présence de STX, alors que LsrtM varie de 50nm (avec une incertitude du même ordre de grandeur). Le fait que la largeur FW-SHG ne varie pas en fonction de la longueur du sarcomère montre également que le signal ne provient pas du recouvrement entre les têtes de myosine et les filaments d'actine.

Nous émettons l'hypothèse, en accord avec nos données expérimentales, que le signal de SHG provient seulement des têtes de myosine. Ces têtes sont arrangées de façon régulière et compacte dans l'espace. Chaque filament comporte en effet environ 300 têtes globulaires [Cautino, 1986], ce qui correspond à une organisation dense non centrosymétrique de chromophores. Il est donc raisonnable de considérer que l'origine du signal de SHG provient de cet arrangement compact anisotrope des têtes globulaires de myosine.

#### Conclusion :

La microscopie de second harmonique permet donc une étude précise des cellules musculaires, elle apporte par rapport à la microscopie classique un aspect quantitatif indispensable aux études morphologiques où des effets faibles sont attendus. En effet, une contracture de l'ordre de 6% sur des objets micrométriques ne peut être décelée en microscopie classique. Nous avons démontré, pour la première fois, que la microscopie SHG, permet d'effectuer une mesure fonctionnelle de nanotoxinologie.



## Conclusion du chapitre IV :

Ce chapitre a été l'occasion de montrer toute la puissance de la microscopie non linéaire en contraste endogène. Nous avons vu comment la combinaison de la SHG et de la TPEF nous permet d'accéder une quantité considérable d'informations quant à la structure des tissus. Nous avons également démontré la facilité de mise en œuvre de cette technique et ces nombreux avantages en histologie.

Nous avons montré également que le collagène de type I, possédait une chiralité par couplage excitonique à l'échelle supramoléculaire. Cette chiralité est absente dans le collagène IV. Elle n'a pas une importance majeure dans le signal de SHG rayonné par les fibres de collagène I. Ce travail a fait ressortir les difficultés à étudier des composés, comme l'élastine et le collagène, sortis de leur environnement biologique.

La facilité de mis en œuvre du contraste endogène a permis de mettre en évidence l'effet destructeur du lindane sur le système vasculaire du rat. Il a été possible de mesurer des distances avec une précision de 20nm grâce à la microscopie de second harmonique combinée à une détection de maximum d'intensité lors d'un traitement des données. Cette précision est nécessaire pour quantifier les déformations induites par la saxitoxine. Nous avons donc démontré, pour la première fois, qu'il est possible de mener des études de nanotoxinologie en microscopie non linéaire par contraste endogène.

Perspectives :

Il est sur des cellules musculaires où l'on suivrait en temps réel les déformations morphologiques de cellules exposées à divers

Spectro

## Conclusion :

Dans ce travail, nous avons étudié les liens existant entre la génération de second harmonique et la chiralité moléculaire présente à la fois dans des molécules synthétiques comme l'ASTB et dans des composés naturels comme le collagène.

Nous avons validé l'extension à l'optique non linéaire du modèle de Kuhn sur l'ASTB qui présente une chiralité par couplage excitonique. Les termes chiraux possèdent alors une origine dipolaire électrique. Nous avons également mis en évidence ce type de chiralité dans le collagène de type I.

Nous avons démontré que la chiralité par couplage entre oscillateurs permet d'améliorer l'imagerie de SHG des membranes en contraste exogène. L'ASTB est un premier prototype de marqueur. Nos résultats ont permis de suggérer des orientations précises pour la synthèse des nouveaux colorants. Les molécules futures, construites sur la base de l'ASTB, devront s'insérer dans les membranes différemment de la molécule actuelle. Sinon, un moyennage orientationnel sur le plan de la membrane sera extrêmement défavorable pour la génération de second harmonique. Nos collaborateurs au Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon travaillent actuellement sur de nouvelles molécules inspirées par l'ASTB.

Nous voulions démontrer la faisabilité d'études pharmacologiques en microscopie non linéaire. Cet objectif a été atteint en mettant en évidence les effets du lindane sur le tissu artériel et en réalisant la première étude nanotoxinologique en contraste endogène.

Pour compléter cette démarche, il faut rechercher une plus grande spécificité des signaux observés. Des améliorations de notre instrument permettront de recueillir plus d'informations sur les objets étudiés et de mieux comprendre l'origine des signaux.

Pour la fluorescence, il faut étudier les effets de l'environnement *in situ* d'une protéine sur son spectre d'émission. Ces études sont actuellement en cours et nécessitent l'utilisation d'un spectroscope sur les lignes de mesure. Ce travail doit être réalisé directement sur le tissu et non *in vitro* comme nous l'avons démontré sur l'élastine. L'association de l'outil spectroscopique et de la microscopie non linéaire en contraste endogène ouvre de nombreuses perspectives. Il sera alors possible de corrélérer les modifications du spectre d'émission de certaines protéines avec des altérations détectées lors d'une étude morphologique rencontrées dans diverses pathologies.

Pour la génération de second harmonique, l'association de l'imagerie de second harmonique avec une analyse polarimétrique paraît judicieuse. Pour cela, nous allons mettre en place un système de détection résolu en polarisation. Il sera intéressant d'imager dans ces conditions les cellules du muscle cardiaque, et différents types de collagène. En parallèle des travaux d'imagerie, une caractérisation plus approfondie du collagène de type II et IV, nous fournira une meilleure compréhension des signaux observés en microscopie.

Ce développement instrumental ne doit jamais être dissocié des applications biologiques. Nous allons ainsi étudier plus en détail certaines altérations de la peau, et nous intéresser à d'autres problèmes pharmacologiques sur le tissu artériel.

## Références bibliographiques :

[Adler, 1964] : Adler E., Nonlinear optical frequency polarization in a dielectric, Phys. Rev. **134**, A728, (1964).

[Alexandre, 2002] : Alexandre M., Thèse de doctorat de l'école normale supérieure de Lyon, (2002).

[Angelova, 1986] : Angelova M.I. and Dimitrov D.S., Liposome electroformation, Faraday Discuss. Chem. Soc. **81**, 300-311, (1986).

[Angelova, 1992] : Angelova M.I., Soléau S., Méléard P., Faucon J.F., Bothorel P., Preparation of giant vesicles by external Ac electric fields. Kinetics and applications. Pogr. Colloid Polym. Sci. **89**, 127-131, (1992).

[Angeluts, 1996] : Angeluts A.A., Balakin A.V., Koroteev N.I., Ozheredov I.A., Pakulev A.V. Resniansky A.Y and Shkurinov A.P., Ultrafast Processes in spectroscopy, Svelto et al. Ed., Plenum Press, New-York, (1996).

[Belkin, 2001] : Belkin M.A., Han S.H., Wei X. And Shen Y.R. , Sum-frequency generation chiral liquids near electronic resonance, Phys. Rev. Lett. **87**, 11301, (2001).

[Beaurepaire, 1999] : Beaurepaire E., Moreaux L., Amblard F. And Mertz J., Combined scanning optical coherence and two-photon excitation microscopy, Opt. Lett. **24**, 969-971 (1999).

[Biot, 1844] : Biot J.B., C.R. Acad. Sci. Paris **19**, 719, (1844).

[Bloembergen, 1965] : Bloembergen N., Nonlinear Optics, World Scientific, (1965).

[Bornstein, 1980] : Bornstein P and Sage H., Structurally Distinct Collagen Types, Annual Revue of Biochemistry, **49**, 957-1003, (1980).

[Bouevitch, 1993] : Bouevitch O., Lewis A., Pinevsky I., Wuksell and Loew L., Probing membrane potentiel with non linear optics, Biophys. J. **65**, 672-679, (1993).

[Both, 2003] : Both M., Vogel M., Fink R.H.A. and uttenweiler D., Second harmonic generation imaging in muscle fibers, Proceedings of SPIE-OSA Biomedical Optics, SPIE **5139**, 112-120, (2003).

[Brant, 1971] : Ware W.R., Lee S.K., Brant G.J., Chow P.P.,) J. Chem. Phys., **54**(11) 4729-4737, (1971).

[Bridges, 1996] : Bridges J.W., Davies, D.S. and Williams R.T., Biochem. J. **98**, 451–468, (1996).

[Brooks, 1990] : Brooks G.T., Lindane: Faraday's hidden legacy, Pesticide Outlook **1**, 4, (1990).

[Byers, 1994] : Byers J.D., Yee H.I. and Hicks J.M., A second harmonic genertion of analog of optical rotary dispersion for the study of chiral monolayers, J. Chem. Phys. **101**, 6233-6241, (1994).

[Campagnolla, 1999] : Campagola P.J., Wei M., Lewis A. and Loew L., High resolution non linear optical imaging of live cells by second harmonic generation, Biophys. J. **77**, 3341-349, (1999).

[Campagnolla, 2002] : Campagola P.J., Millard A.C., Terasaki M. Hope P.E., Malone C.J. and Mohler W., Biophys. J. **81**, 493, (2002).

[Catell, 1996] : Cattell M.A., Anderson J.C. and Hasleton P.S., Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta, Clin. Chim. Acta **245**, 73–84, (1996).

[Cautino, 1986] : Cautno M., Squire J., Restingmyosin cross-bridge configuration in frog muscle thck filament, J. Cell. Biol. **102**, 610-618, (1986).

[Civatte, 1982] : Civatte J., Histopathologie cutanée, Paris, 2<sup>e</sup> éd., (1982).

[*Codex Alimentarius*, 1998] : Codex Alimentarius Commission, Consideration of intake of pesticide residues: Reports on pesticide residue intake studies at international and national level based on revised guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues, Reports of 13TH session of the Codex committee on pesticide residues, FAO/WHO, (1998).

[Cleary, 1996] : Cleary E.G., and Gibson M.A. in Extracellular Matrix, ed. Comper, W. D. (Harwood, London), **Vol. 2**, pp. 95–140, (1996).

[Crawford ,1994] : Crawford M.J., Haslam S., Probert J.M., Gruzdkov Y.A. and Frey J.G., second harmonic generation from air/water interface of an aqueous solution of the dipeptide Boc-Trp-Trp, *Chem. Phys. Lett.* **229**, 260, (1994).

[Deyl, 1980] : Deyl Z., Macek K., Adam M. and Vancikova, O. *Biochim. Biophys. Acta* **625**, 248–254, (1980).

[Dombeck, 2004] : Dombeck D.A., Blanchard-Desce M., Webb W.W., Optical recordings of action potentials with second-harmonic generation microscopy, *Journal of neuroscience* **24**(4), 999-1003, (2004).

[Eyre, 1980] : Eyre D.R., Collagen : molecular diversity in the body's protein scaffold, *Science*, **207**, (1980).

[Fine, 1971] : Fine S. and Hansen W.P., Optical second harmonic generation in biological systems, *Appl. Opt.* **10**, 2350-2353, (1971).

[Gallop, 1975] : Gallop P.M. and PAZ A., Post-Translational Protein Modification with special attention to collagen and elastin, in *Physiol. Res.*, vol. **LV**, 418-487, (1975).

[Giordmaine, 1965] : Giordmaine J.A., Non linear optical properties of liquids, *Phys. Rev. 6A*, 1599, (1965).

[Göppert-Mayer, 1931] : M. Göppert-Mayer, über Elementarakte mit zwei quantensprüngen, *Annalen der Physik* **9**, 273-294, (1931), German.

[Guo, 1997] : Guo Y., Ho P.P., Savage H., Harris D., Sacks P., Schantz S., Liu F., Zhadin N. And Alfano R.R., Second-harmonic tomography of tissues, Opt. Lett. **22**, 17, 1323-1325, (1997).

[Guyot-Sionnest, 1986] : Guyot-Sionnest P., Chen W., Shen Y.R., Phys. Rev. B **35**, 4420-26, (1986).

[Guyot-Sionnest, 1988] : Guyot-Sionnest P., Shen Y.R., Phys. Rev. B **38**, 7985-89, (1989).

[Hache, 2001] : Hache F., Mesnil H. and Schanne-Klein M.C., J. Chem. Phys. **115**, 6707, (2001).

[Hecht, 1996] : Hecht L. And Barron L.D., New aspects of second-harmonic optical activity from chiral surfaces and interfaces, Molecular Phys. **89**, 61, (1996).

[Heinz, 1983] : Heinz T.F., Tom H.W.K. and Shen Y.R., Phys. Rev. A **28**, 1883, (1983).

[Heinz, 1991] : Heinz T.F., Non Linear Electromagnetic Phenomena, Elsevier Science Publishers, (1991).

[Hornebek, 1987] : Hornebek W. and Robert L., Elastase Type Protcases of the Arterial Wall : their Properties and Biological Role, in G. Jolles, Y. and J. Legrand, A. Nurden dir., Biologie and Pathology of Platelet-Vessel Wall Interactions, pp. 124-144, Academic Press, New York, (1987).

[Huang, 2002] : Huang S.H., Heikal A.A. and Webb W.W., Biophys. J. **82**, 2811–2825, (2002).

[Jakson, 1975] : Jakson J.D., Classical electrodynamics, Mac Graw-Hill, New-York, (1975).

[Kauranen, 1994] : Kauranen M., Verbiest T., Maki J.J. and Persoons A., qualitative determination of electric and magnetic second order susceptibility tensors of chiral surfaces, Phys. Rev. B **55**, R1985, (1994).

[Kauranen, 1998] : Kauranen M., Verbiest T., and Persoons A., Second order nonlinear optical signatures of surface chirality, *J. Modern Optics* **45**, 403-424, (1998).

[Kauzmann, 1957] : Kauzmann W., *Quantum Chemistry*, Academic press, New-York, (1957).

[Keeley, 2004] : Keeley FW., Cours sur l'élastine, Department of Biochemistry, University of Toronto, (2004).

[Kielty, 1993] : Kielty C.M., Lees M., Shuttleworth C.A. and Woolley D., Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 1230–1236, (1993) .

[Kvitek, 1991] : Kvitek R.G. and Beitler M.K., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 69 - 47, (1991).

[Kuhn, 1929] : Kuhn W., *Z. Phys. Abt. B* **4**, 14, (1929).

[Lakowicz, 1982] : Lakowicz J.R. and Balter A., Analysis of excited state processes by phase-modulation fluorescence spectroscopy, *Biophys. Chem.* **16**, 117-132, (1982).

[Lakowicz, 1983] : Lakowicz J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, New-York Plenum Press, (1983).

[Landau, 1960] : Landau L.D., Lifshitz E.M., *Electrodynamics of Continuous Media*, Course of Theoretical Physics, Pergamon, New-York, Vol.8, (1960).

[Le parc, 2003] : Le parc J.M., Marfan Syndrome, *Orphanet Encyclopedia*, (2003).

[Lhomme, 1999] : Tatibouët A., Demeunynck M., Andraud C., Collet A. and Lhomme J., Synthesis and study of an acridine substituted Tröger's base : preferential binding of the (-)-isomer to B-DNA, *Chem. Commun.*, 161-162, (1999).

[Lhoste, 2002] : Lhoste F., *Bêta-bloquants*, *Encyclopedia Universalis*, (2002).

[Maiti, 1997] : Maiti S., Shear J. B., Williams R. M., Zipfel W.R. and Webb, W.W. Science 275, 530–532, (1997).

[Maki, 1995]: Maki J.J., Kauranen M. and Persoons A., Second harmonic generation from chiral materials, Phys. Rev. B **51**, 1425-1434, (1995).

[Maki, 1996] : Maki J.J., Verbiest T., Kauranen M., Van Elshocht and Persoons A., comparison of linearly and circularly polarized probes of second order optical activity of chiral surfaces, J. Chem. Phys. **105**, 767, (1996).

[Mertz, 2001] : Mertz J., Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers, Optics Communications **196**, 325-320, (2001).

[Mesnil, 2001] : Mesnil H., Etude théorique et expérimentale des propriétés d'optique non-linéaire dans une solution de molécules chirales : dichroïsme circulaire non-linéaire, Thèse de doctorat de l'université Paris XI, (2001).

[Moreaux, 2000] : Moreaux L., Sandre O., Blanchard-Desce M., Mertz J. Membrane imaging by simultaneous second harmonic generation and two-photon microscopy, Optics Letters **25**(5), 320-322. Errata Optics Letters, **25** (9), 678, (2000).

[Moreaux, 2002] : Moreaux L., Thèse de doctorat de l'Université Paris XI, (2002).

[Moses, 1993] : Moses M., Pesticides and breast cancer, Pesticides News **22**, 3-5, (1993).

[Narahashi, 2000] : Narahashi T., Fenster C.P., Quick M.W., Lester R.A., Marszalec W., Aistrup G.L., Sattelle D.B., Martin B.R., Levin E.D., Effects of toxic extracts and purified borotoxins from *Prorocentrum borbonicum* (Dinophyceae) on vertebrate neuromuscular junctions, Toxicol Sci., **57(2)**, 193-202, (2000).

[Oheim, 2001] : Oheim M., Beaurepaire E., Chaigneau E., Mertz J. and Charpak S., Two-photon microscopy in brain tissue : parameters influencing the imaging depth, Journal of Neuroscience Methods **111**, 29-37.

[Pasteur, 1853] : Pasteur L., C.R. Acad. Sci. Paris **37**, 162, (1853).

[Pages, 2002] : Pagès N., Sauviat M.P., Bouvet S. et Goudey-perrière F., Toxicité du lindane sur la reproduction, Journal de la Société de Biologie **196(4)**, 325-339, (2002).

[Perez, 1994] : Pérez J.P., Optique géométrique et ondulatoire, 4iéme édition, Masson, (1994).

[Pershan, 1963] : Pershan P.S., Phys. Rev. **130**, 919, (1963).

[Piston, 1994] : Piston D.W., Kirby M.S., Cheng H.P., Lederer W.J. and Webb W.W., Appl. Opt. **33**, 4265–4269, (1994).

[Poynard, 1997] : Poynard T., Bedossa P. and Opolon P., for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis, C. Lancet, **349**:825-32, (1997).

[Prockop, 1984] : Prokop D.J. and Kivirikko K.I., Heritable Diseases of collagen , M. Engl. J. Med., **311**, (1984).

[Richards, 1959] : Richards B. and Wolf E., Diffraction in optical systems, 2. structure of image field in an aplanatic system, Proc. R. Soc. Lon. Ser. A **253**, 358-379, (1959).

[Richards-Kortum, 1996] : Richards-Kortum, R. & Sevick-Muraca, E. (1996) Annu. Rev. Phys. Chem. **47**, 555–606.

[Robert, 1980] : Robert L. and Robert A., Elastin, elastase and arteriosclerosis, Frontiers of Matrix Biology, **VIII**, pp. 130-173, S. Karger, 1980.

[Robert, 1989] : Robert L., Le Tissu conjonctif - L’Élastine , Précis de physiologie cutanée, pp. 155-173, Les Horloges biologiques : histoire naturelle du vieillissement, Flammarion, (1989).

[Robillot, 2002] : Ten-Hage L, Robillot C., Turquet J., Le Gall F., Le Caer J.P., Bultel V., Guyot M., Molgo J., Effects of toxic extracts and purified borbotoxins from *Prorocentrum* *baboronicum* (Dinophyceae) on vertebrate neuromuscular junctions, *Toxicon*. Feb, **40**(2), 137-48, (2002).

[Rodger, 1997] : Rodger A. and Norden B., Circular dichroism and linear dichroism, Oxford University Press, Oxford U.K., (1997).

[Sandberg, 1977] : Sandberg L.B., Gray W. And Franzblau C., Elastin and elastic tissues, in Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. **LXXIX**, Plenum Press, New York, (1977).

[Sandre, 2001] : Sandre O., Thèse de doctorat de l'université Paris VI, (2001).

[Sauviat, 2002] : Sauviat M.P. Pages N., Cardiotoxicité du lindane, un isomère  $\gamma$  de l'hexachlorocyclohexane, *Journal de la Société de Biologie*, **196** (4), 339-348, (2002).

[Sauviat, 2002b] : Sauviat M.P., Colas A. et Pages N., Does lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) increase the rapid delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current (IKr) in frog atrial myocytes, *BioMed Central Pharmacology* **2**, 15, (2002).

[Schanne, 1998] : Schanne-Klein M.C., Hache F., Roy A., Flytzanis C. and Payrastre C., Off resonance second ordre optical activity of isotropic layers of chiral molecules : observation of electric and magnetic contributions, *J. Chem. Phys.* **108**, 9436-9443, (1998).

[Schanne, 2001] : Schanne-Klein M.C., Boulesteix T., Hache F., Alexandre M., Lemercier G. and Andraud C., Strong chiroptical effects in surface second harmonic generation obtained for molecules exhibiting excitonic coupling chirality, *Chem. Phys. Lett.* **362**, 103 (2002).

[Shen, 1984] : Y. R. Shen (1984), *The Principles of non linear Optics*, Wiley-Intersciences.

[Shen, 1989] : Shen Y.R., *Annu. Rev. Phys. Chem.* **40**, 351-74, (1989).

[Sheppard, 1990] : Sheppard C.J.R and Gu M., Image-formation in 2-photon fluorescence microscopy, Optik **86**, 104-106, (1990).

[Squirrell, 1999] : Squirrell J.M., Wokosin D..L, White J.G., Bavister B.D., Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability, Nat Biotechnol., **17(8)**, 763-7, (1999).

[Starcher, 1976] : Starcher B.C., Galione, M.J., Anal. Biochem. **74**, 441, (1976).

[Stolle, 1994] : Stolle R., Loddoch M. and Marowsky G., Theory of second harmonic circular dichroism at surfaces, Non linear Optics **8**, 79, (1994).

[Svirko, 1998] : Svirko Y.P and Zheludev, Polarization of light in non linear optics, Wiley, New-York, (1998).

[Tatibouët, 1999] : Tatibouët A., Demeunynck M., Andarud C., Collet A., Lhomme J., Chem. Commun., (1999).

[Tatibouët, 1996] : Tatibouët A., Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier, Grnoble I, (1996).

[Thompson, 2002] : Thompson R.E., Larson D.R. and Webb W.W., Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probe, Biophys. J. **82**, 2775-2783, (2002).

[Trinick, 1999] : Trinick J., Tskhovrebova L., Titin: a molecular control freak, Trends in cell biology, **9 (10)** , 377-380, (1999).

[Ushiki, 2002] : Ushiki T., Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers : a comprehensive understanding from a morphological viewpoint, Arch Histol Cytol., **65(2)**, 109-26, (2002).

[Verbiest, 1995] : Verbiest T., Kauranen M., Maki J.J., Teerenstra M.N., Schouten A.J., Nolte R.J.M. and Persoons A., J. Chem. Phys. **103**, 8296, (1995).

[Ware, 1988] : Ware G.W., US-EPA Office of drinking water health advisories, Res. Environ. Contam. Toxicol., **123**, 1-155, (1988).

[Webb, 1990] : Denk W., Strickler J. And Webb W.W., Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, Science **248**, 73-76, (1990).

[Weber, 1969] : Spencer R.D. and Weber G., Measurements of subnanosecond fluorescence lifetimes with a cross-correlation phase fluorometer, Annals New-York academy of Sciences **158**, 361-376, (1969).

[Wrona, 1998] : Wrona, M. Z. and Dryhurst, G. Chem. Res. Toxicol. **11**, 639–650, (1998).

[Xu, 1996a] : Xu C., Webb W. W., Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 nm to 1050 nm, J. Opt. Soc. Am. B **13**(3), 481-491, (1996).

[Xu, 1996b] : Xu C., Zipfel W., Shear J.B., Williams R.M. and Webb W. W., Multiphoton fluorescence excitation : New spectral windows for biological non linear microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**, 10763-10768, (1996).

[Yu, 1996] : Yu W, So PT, French T, Gratton E. Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach Biophys J., **70**(2), 626-36, (1996).

[Yuste, 1995] : Yuste R. and Denk W., Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration, Narture **375**, 682-684, (1995).

[Zipfel, 2003] : Zipfel W.R., Williams R.M., Christie R., Nikitin A.Y., Hyman B.T., Webb W.W., Live intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second-harmonic generation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** (12), 7075-7080 (2003).

[Zoumi, 2002] : Zoumi A., Yeh A. and Tromberg, B.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 11014–11019, (2002).

# Microscopie non linéaire : chiralité et génération de second harmonique

Depuis 1990, la microscopie non linéaire de fluorescence excitée à deux photons (TPEF) ou de génération de second harmonique (SHG) a insufflé un nouvel élan à la microscopie optique. Il est possible de réaliser de l'imagerie fonctionnelle tridimensionnelle de tissus épais vivants ou de cellule. Le contraste provient soit de colorants optimisés pour l'imagerie non linéaire (contraste exogène), soit de protéines naturellement présentes dans les tissus comme l'élastine ou le collagène (contraste endogène). Nous abordons la microscopie non linéaire de ces deux points de vue, essentiellement en SHG mais aussi en TPEF.

Notre travail sur les colorants pour la microscopie SHG s'appuie sur l'étude optique non linéaire des mécanismes intervenant dans l'activité optique des molécules chirales (la chiralité est la propriété d'un objet de ne pas être superposable à son image dans un miroir). La chiralité du colorant doit permettre d'améliorer l'imagerie membranaire de second harmonique quand les molécules se répartissent de part et d'autre de la membrane dans un arrangement centro-symétrique. Nous démontrons que le signal est conservé dans cette géométrie uniquement pour une chiralité par couplage excitonique. Dans ce but, nous avons travaillé sur un colorant synthétisé par le Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon qui possède ce type de chiralité : l'ASTB (base de Troger substituée par deux acridines).

Le travail sur ce colorant s'effectue alors dans deux directions, d'une part tester l'extension du modèle des oscillateurs couplés aux effets chiroptiques non-linéaires et d'autre part, montrer que ce colorant possède le type de chiralité optimal pour exalter le signal de second harmonique membranaire. La mesure résolue en polarisation du signal de second harmonique réfléchi par un film mince de ce colorant permet de valider notre modèle. Des vésicules artificielles mimant les membranes cellulaires permettent d'étudier son comportement comme colorant membranaire.

Nous étudions et utilisons deux sources de contraste endogènes : le collagène (source de SHG) et l'élastine (source de TPEF). Après caractérisation des propriétés optiques non linéaires de ces deux protéines, nous montrons comment la microscopie non linéaire combinée de TPEF et de SHG peut remplacer avantageusement l'histologie classique. Nous démontrons la faisabilité d'une étude morphologique sur du tissu artériel épais vivant de Rat. Nous mettons alors en évidence les effets du lindane (un insecticide très répandu) sur le système cardio-circulatoire. L'étude montre de nombreuses altérations de l'élastine du tissu cardiaque tant au niveau de l'aorte que de l'artère carotide. Ces altérations se retrouvent, en partie, dans les artères d'animaux non traités au lindane mais descendant de père traité avec une dose résiduelle de toxique. Ce travail montre l'existence d'effets de l'insecticide sur la descendance.

Nous réalisons la première étude nanotoxinologique en microscopie non linéaire à partir du signal de second harmonique des filaments de myosine. Nous mesurons une contracture au repos de cellules atriales de grenouille soumises à une toxine (la saxitoxine), avec une précision de 20 nm.

# Nonlinear microscopy : chirality and second harmonic generation

Nonlinear microscopy enables functional 3D imaging of living thick tissues or cells. The contrast in imaging may come from synthetic dyes (exogenous contrast) or from proteins in tissues (endogenous contrast). We perform nonlinear microscopy with both of these approaches. In particular, we use SHG (Second Harmonic Generation) and TPEF (Two Photon Excited Fluorescence).

Our work on dyes for SHG microscopy rests on nonlinear optical study of the mechanisms of optical activity in chiral molecules. The chirality of dyes should enhance SHG membrane's imagery when molecules are in centrosymmetric arrangement in membranes. We demonstrate that chirality of the dye must come from an excitonic coupling. We study such a colorant : the ASTB (Acridin Substituted Troger Base).

We study and use two sources of endogenous contrast : collagen (SHG) and elastin (TPEF). After characterisation of their nonlinear optical properties, we demonstrate that the combination of TPEF and SHG in microscopy enables a morphological study of fresh living arterial tissue in Rats. We also show the dramatic effects of lindane (an insecticide) on the vascular system.

We perform the first nanotoxinologic study in nonlinear microscopy based on SHG signal from myosin filaments. We measure a contracture of atrial frog cells with the introduction of a toxin (saxitoxin) with a resolution of 20 nm.