

Sujet:

Stage de Recherche en Microscopie multimodale CARS-Fluorescence

Discriminer des signaux d'intérêt sur des structures Biologiques



Réalisé par :

AHOUEL Sara

Master 2 BIMNS (Bio Ingénierie Médicament NanoSanté)

Travaux encadrés par :

Docteur Dominique DUMAS



I. INTRODUCTION

1. Définition :

Le **CARS** est une techniques optiques non linéaires (**NLO**).

- Les techniques NLO regroupes une multitude de phénomènes optiques :

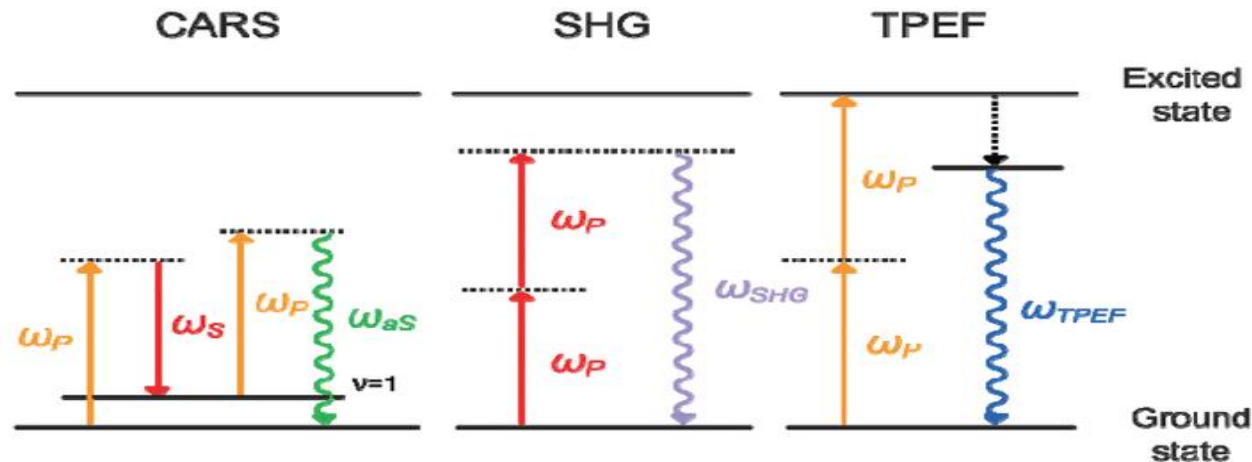


Figure 1 : Représentation schématique de niveaux d'énergie des trois mécanismes de contraste non linéaires, de la fluorescence excitée à deux photons TPEF (à droite), de la génération de seconde harmoniques SHG (milieu) et de la diffusion Raman cohérente antistokes (à gauche). TPEF se produit par l'absorption de deux photons via des niveaux d'énergie virtuels intermédiaires (ligne pointillée). En SHG, deux photons sont combinés de la même façon, mais l'émission se produit directement à partir d'un niveau virtuel de courte durée sans excitation vers les États électroniques supérieurs. Dans le processus CARS, deux photons stimulent un mode vibratoire sélectionné. Le sondage de ce niveau avec le troisième photon d'excitation entraîne l'émission du signal CARS.

I. INTRODUCTION

2. CARS avantages :

- Dans un processus CARS, le contraste de l'image est obtenu grâce aux vibrations des liaisons chimiques endogènes :
 - Pas de sondes fluorescentes naturelles ou artificielles.
 - Pas de toxicité.
 - Pas de photoblanchiment des fluorophores.
- Le CARS est particulièrement bien adapté à l'étude des lipides.
- Le CARS permet une imagerie vibratoire rapide à des puissances d'excitation modérées (tolérées par la plupart des échantillons biologiques).
- Permet l'étude des cellules en milieu aqueux.
- Permet l'imagerie en 3D grâce aux impulsions Laser proche IR (pénétration optique en profondeur).
- Offre une meilleure résolution grâce aux impulsions picosecondes.
- Offre des propriétés de multimodalité, où la même plateforme est utilisée pour réaliser les autres techniques d'imagerie NLO.

II. OBJECTIF

Discriminer des signaux d'intérêt sur des structures biologiques :

- ❑ Après Optimisation du système (Des billes de calibration en polystyrène).

- ❑ Application en diagnostic sur un modèle cellulaire (Des CSMs à différents passages de culture) :
 - Imager des cellules avec deux modalités TPEF (Auto fluorescence) et en CARS (ciblant les liaisons C-H lipidiques).
 - Evaluer le comportement des cellules étudiées en fonction de leurs stades de culture.
 - mettre en évidence une différence significative entre les CSMs en passages précoces et tardifs de leur culture, et identifier ainsi si possible la présence de marqueur précoce de sénescence.

III. MATERIEL ET METHODE

1. Instrumentation :

- Système composé de plusieurs parties.
- Suivre les instructions sur le manuel d'utilisation du système, et s'assurer que les outils sont activés dans l'ordre indiqué.

Refroidisseur
du Laser



Laser (1064nm,
picoEmerald)



III. MATERIEL ET METHODE

2. Spécimen d'étude :

Des CSMs issues de la gelée de Wharton à différents passages de culture in vitro (modèle d'étude pour démontrer le potentiel de la microscopie multimodale CARS-Fluorescence dans le diagnostic) :

Les cellules sont fournies par des partenaires à l'état natif sans fixation ni marquage. 3 passages différents des CSMs sont étudiés : passage précoce P5, passage intermédiaire P8 et passage tardif P11.

- **Etude spectrale** : réaliser des spectres d'excitation avec les 2 modalités (CARS et TPEF « auto fluorescence »).
- **Etude qualitative par imagerie** : Les CSMs aux passages P5, P8 et P11 sont imagées avec les deux modalités TPEF à 816nm et CARS (1064+816nm, vibration de 2855cm^{-1}) propre aux liaisons CH₂ symétriques des lipides.
- **Etude quantitative par mesure d'intensité du niveau du gris** : Les CSMs sont imagées en deux modalités CARS à 2855cm^{-1} et TPEF à 816nm. Les captures d'images sont réalisées sur 5 cellules différentes pour chaque passage.

IV. RESULTATS

Application de la multimodalité CARS-Fluorescence pour le diagnostic sur les CSMs (01):
Etude spectrale :

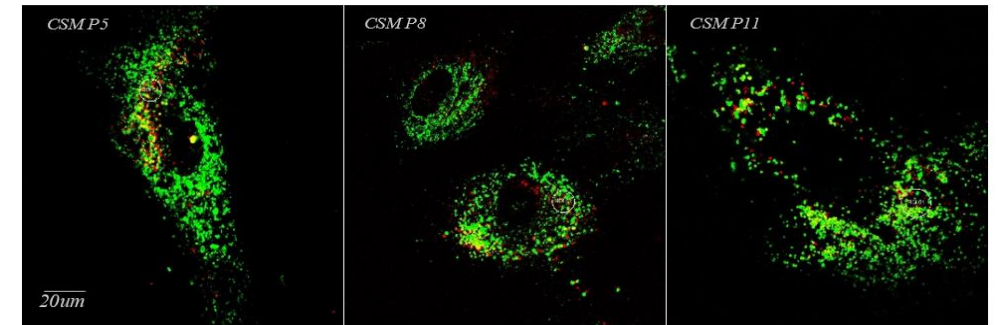
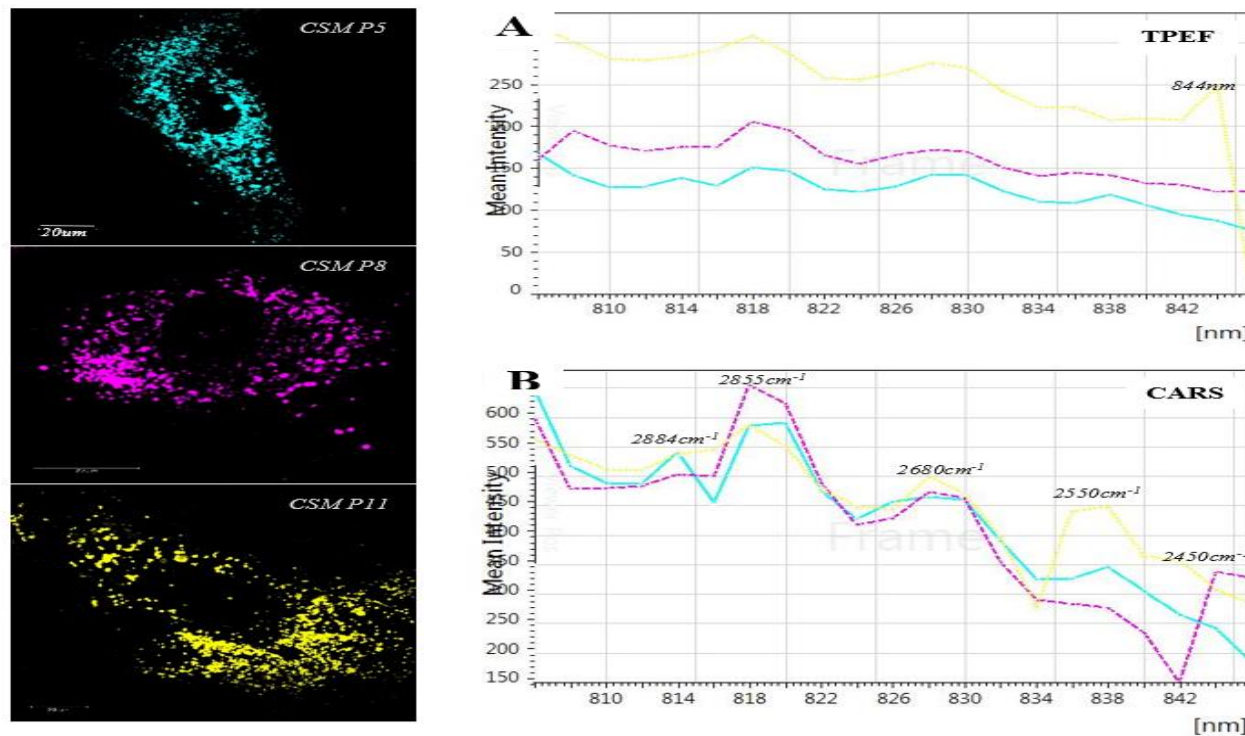


Figure 14 : Images obtenues par merge entre le mode CARS (en vert) et le mode TPEF (en rouge), les spots en jaune correspondent à une superposition entre le vert (CARS) et le rouge (TPEF).

Figure 13 : images et spectres d'excitation des CSMs aux passages précoces P5 (cyan), passage intermédiaire P8 (rose) et le passage tardif P11 (jaune). Les spectres en A correspondent à l'excitation en mode TPEF et le spectre en B correspond à l'excitation en mode CARS.

IV. RESULTATS

Application de la multimodalité CARS-Fluorescence pour le diagnostic sur les CSMs (02)

Etude qualitative par imagerie et quantitative par mesure d'intensité du niveau de gris :

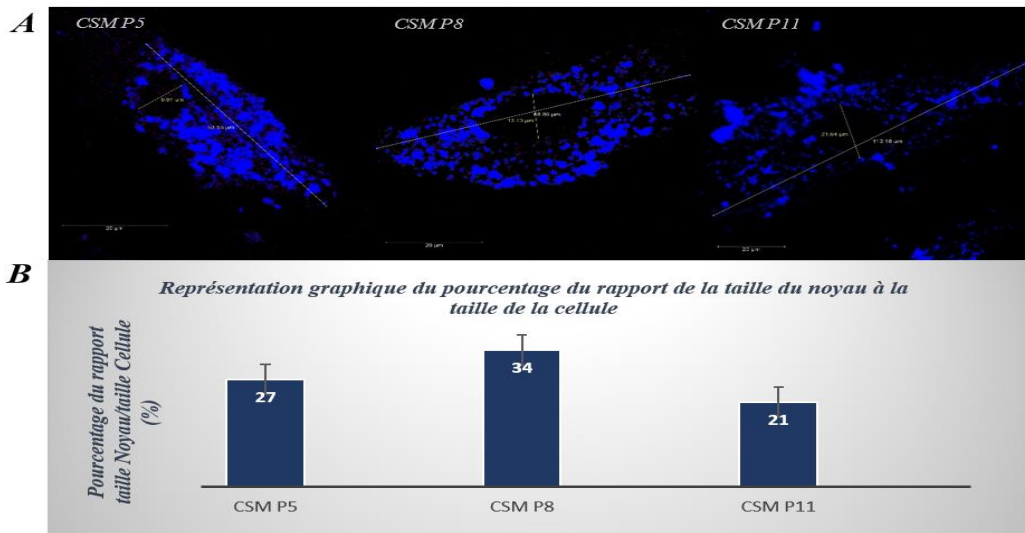


Figure 15 : Images des CSMs aux passages P5, P8 et P11, avec mesure de la taille des noyaux et des cellules (A), les histogrammes en (B) correspondent aux pourcentages obtenus à partir du rapport de la moyenne des tailles des noyaux à la moyenne des tailles des cellules, pour chaque passage indépendamment.

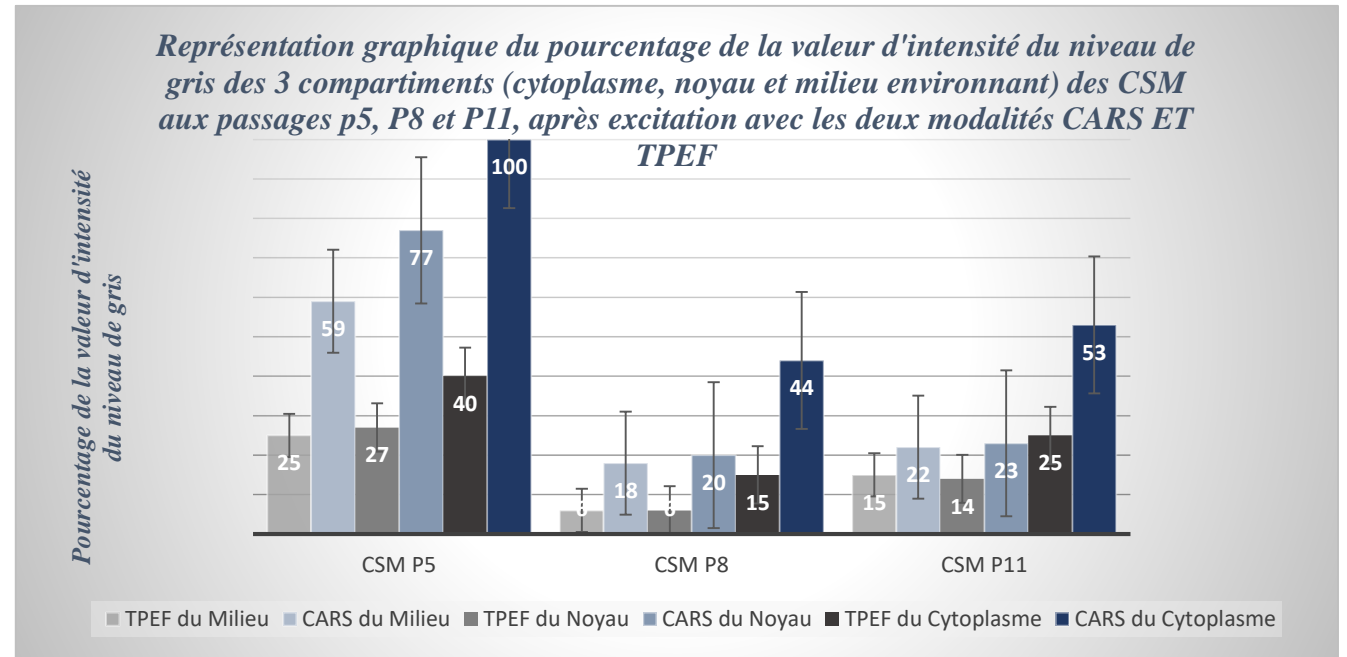


Figure 17 : Représentation graphique du pourcentage de la valeur d'intensité du niveau du gris des trois zones sélectionnées : le cytoplasme, le noyau et le milieu entourant la cellule, chez des CSMs aux passages P5, P8 et P11. Les CSMs ont été imagées avec les deux modalités CARS en nuance de Bleu, et TPEF en nuance de Gris. Les pourcentages de toutes les CSMs et toutes les zones d'intérêt et des deux modalités ont été calculé à partir des moyennes de plusieurs échantillons et reporté à la valeur maximale obtenue.

VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Application de la multimodalité CARS-Fluorescence pour le diagnostic sur les CSMs

- L'excitation en mode CARS, montre plusieurs pics :
 - 2884cm⁻¹ propre des lipides, présent en forte intensité dans le passage P5 => les CSMs en P5 synthétisent plus de **lipide** que les autres passages.
 - 2450cm⁻¹ propre aux vibrations des liaisons C-C et C-N (carbone et nitrile) chez les P8 => liaisons présentes dans le groupement fonctionnel de tous les acides aminés => synthèse de **protéines** plus importante chez les P8.
 - 2550cm⁻¹ propre aux vibrations des liaisons SH, présentant une forte intensité chez les passages P11 => les CSMs en P11 fabriquent plus de molécules contenant le soufre (**acides aminés** tels que **la cystéine**) => rôle dans la formation du **glutathion**, et la composition des **filaments d'actine et de myosine**.
- En mode TPEF (*figure 13-A*) un seul pic :
 - 844nm, présent uniquement chez les P11 => l'auto fluorescence d'une molécule (protéine), qui est synthétisée uniquement par les P11.
- Le pourcentage du rapport taille noyau/ taille cellule est beaucoup plus élevé chez les passages P8 => noyau occupe une grande partie de la cellule => transcription d'ADN => synthèse des protéines. (OK avec les spectres).
- L'intensité du niveau du gris est réduite de moitié à partir du P8 => activité métabolique diminuée avec les passages.

VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

- Utiliser la même configuration pour un autre type de diagnostic : étude menée par Thuc T. Le et ces collègues pour démontrer l'athérosclérose.

(Les auteurs ont utilisé le CARS pour visualiser les gouttelettes lipidiques et la TPEF pour visualiser l'auto fluorescence des LDL) (*figure 18*).

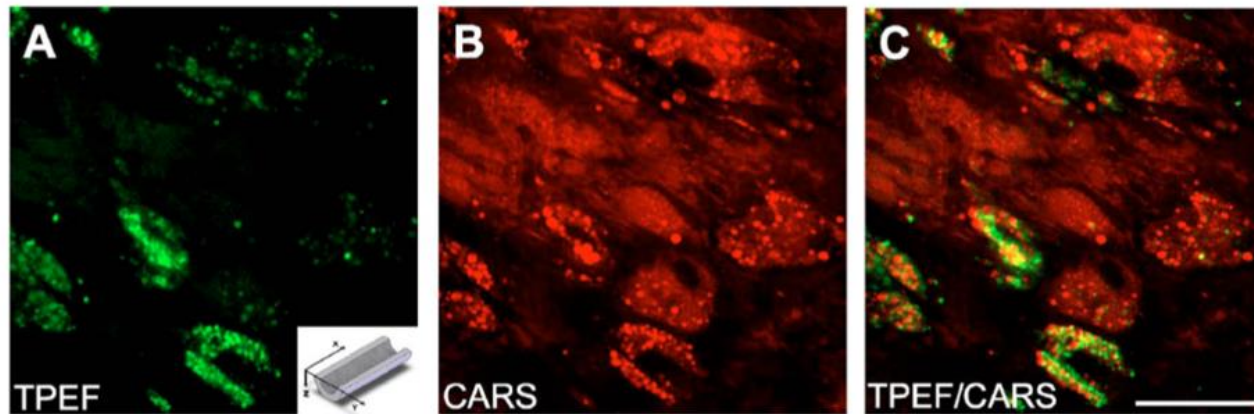


Figure 18 : Caractérisation des agrégats de LDL oxydés et des gouttelettes lipidiques dans les cellules riches en lipides d'une plaque d'athérosclérose par TPEF et la microscopie CARS. (a) l'image TPEF des agrégats de LDL oxydés et (b) les image CARS des gouttelettes lipidiques dans une lésion d'athérosclérose. Les images ont été acquises avec un objectif de 20 × air. Barres d'échelle : 25 μm . (c) superposition des images du TPEF (vert) et du CARS (rouge). (d) spectres d'émission des signaux TPEF à partir des agrégats de LDL oxydés (vert) et des signaux CARS à partir de gouttelettes lipidiques (rouge).

VI. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

- Perspectives encore plus large : combinée cette multimodalité CARS-Fluorescence avec le FLIM.
 - Potentiel d'utilisation en cancérologie pour distinguer entre des glioblastomes souches et différenciés, grâce au temps de déclin (ou durée de vie).

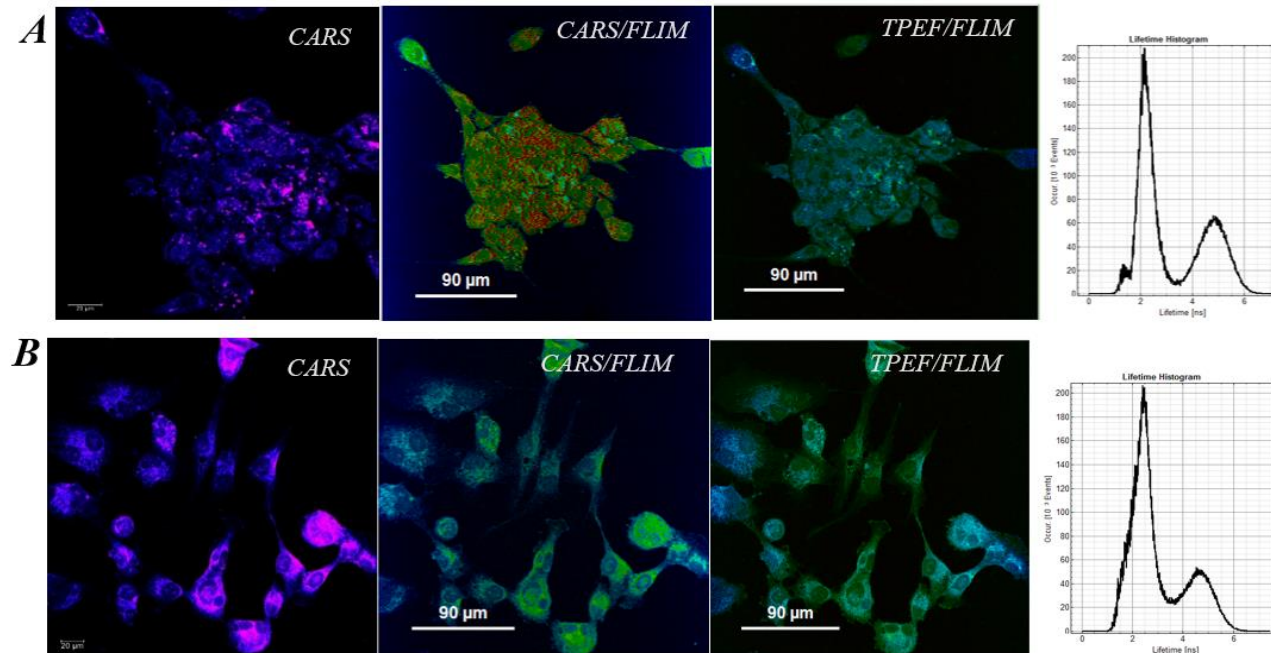


Figure 19 : images présentant des Glioblastomes souches (en A) et des glioblastomes différenciés (en B) imagés par CARS, CARS/FLIM et TPEF/FLIM et leurs spectres de déclin (à droites des images).

Sujet:

Stage de Recherche en Microscopie multimodale CARS-Fluorescence

Discriminer des signaux d'intérêt sur des structures Biologiques



Réalisé par :
AHOUEL Sara

Master 2 BIMNS (Bio Ingénierie Médicament NanoSanté)

Travaux encadrés par :
Docteur Dominique DUMAS

