



**HAL**  
open science

**Mise au point chez le rat d'un capteur à fibre optique  
pour la mesure de la fluorescence résolue en temps  
induite par laser et émise par le cerveau.**

Stéphane Mottin

► **To cite this version:**

Stéphane Mottin. Mise au point chez le rat d'un capteur à fibre optique pour la mesure de la fluorescence résolue en temps induite par laser et émise par le cerveau.. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1993. Français. NNT : 1993INPG4206 . tel-00844337

**HAL Id: tel-00844337**

**<https://theses.hal.science/tel-00844337>**

Submitted on 15 Jul 2013

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

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

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE  
DES MINES DE SAINT-ÉTIENNE

INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE

N° ORDRE: 98CD

## THESE

présentée par

**Stéphane, MOTTIN**

pour obtenir le titre de

## DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE  
ET DE  
L'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE  
DES MINES DE SAINT-ÉTIENNE

MISE AU POINT CHEZ LE RAT D'UN CAPTEUR À FIBRE  
OPTIQUE POUR LA MESURE DE LA FLUORESCENCE  
RÉSOLUE EN TEMPS INDUITE PAR LASER ET ÉMISE PAR  
LE CERVEAU.

Application au cycle veille-sommeil.

soutenue à SAINT-ÉTIENNE le 14 octobre 1993

### *COMPOSITION du JURY:*

Monsieur	M. JOUVET	Président
Madame	A. CHERUY	Examineur
Messieurs	R. CESPUGLIO	"
	C. TRAN-MINH	"
	P. LAPORTE	) Rapporteurs
	J. VIRET	



ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE  
DES MINES DE SAINT-ÉTIENNE

INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE

N° ORDRE: 98CD

## THESE

présentée par

**Stéphane, MOTTIN**

pour obtenir le titre de

## DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE  
ET DE  
L'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE  
DES MINES DE SAINT-ÉTIENNE

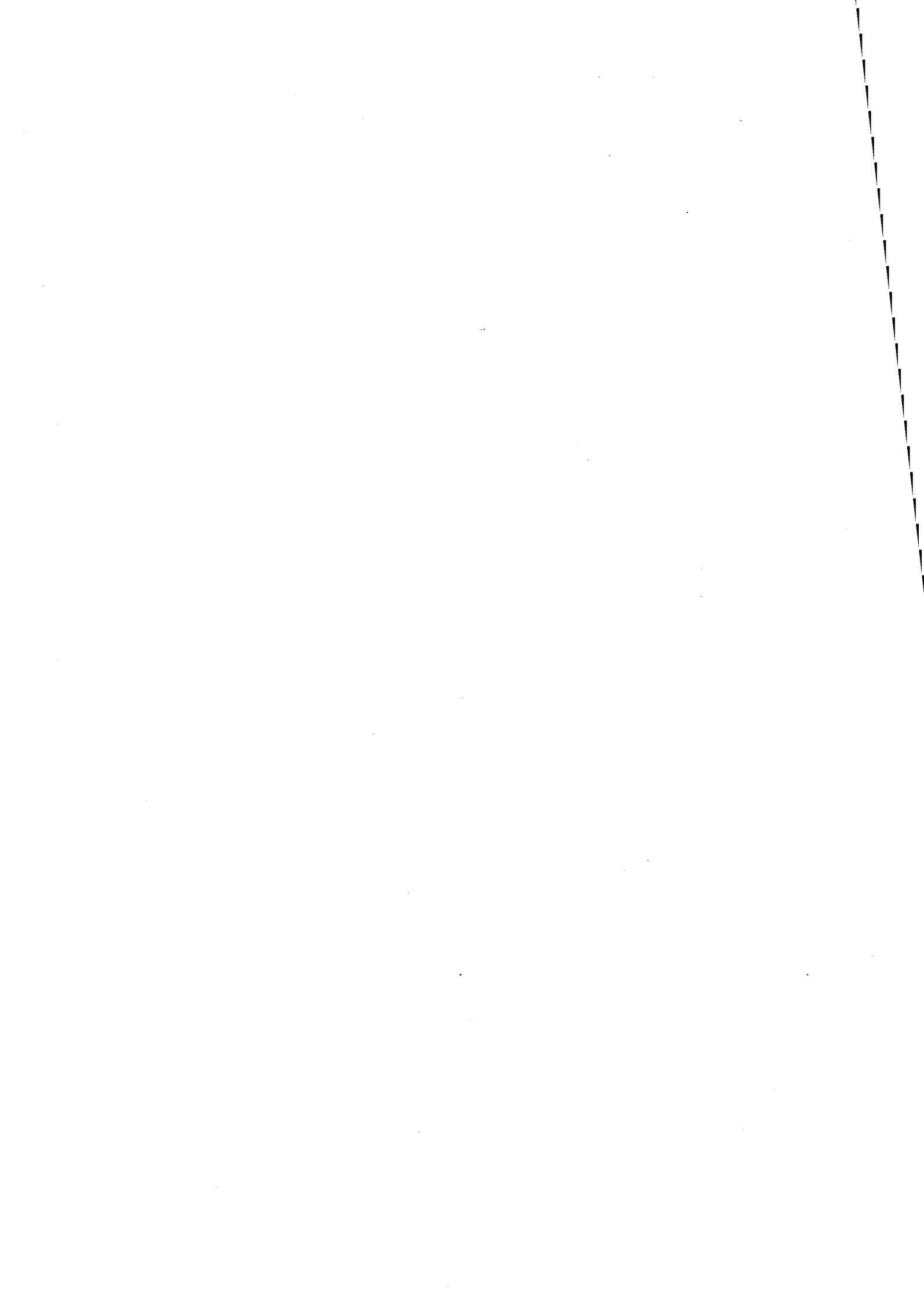
MISE AU POINT CHEZ LE RAT D'UN CAPTEUR À FIBRE  
OPTIQUE POUR LA MESURE DE LA FLUORESCENCE  
RÉSOLUE EN TEMPS INDUITE PAR LASER ET ÉMISE PAR  
LE CERVEAU.

Application au cycle veille-sommeil.

soutenue à SAINT-ÉTIENNE le 14 octobre 1993

### *COMPOSITION du JURY:*

Monsieur	<b>M. JOUVET</b>	<b>Président</b>
Madame	<b>A. CHERUY</b>	<b>Examineur</b>
Messieurs	<b>R. CESPUGLIO</b>	"
	<b>C. TRAN-MINH</b>	"
	<b>P. LAPORTE</b> )	<b>Rapporteurs</b>
	<b>J. VIRET</b> )	



# ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT ETIENNE

Directeur	:	M. Philippe	HIRTZMAN
Directeur de la recherche	:	M. Michel	SOUSTELLE
Directeur de l'enseignement et de la formation	:	M. Albert	MATHON
Secrétaire général	:	M. Jean.Claude	PIATEK

---

## PROFESSEURS DE 1ère CATEGORIE

MM.	BISCONDI	Michel	Matériaux
	DAVOINE	Philippe	Hydrogéologie
	FORMERY	Philippe	Mathématiques Appliquées
	LALAUZE	René	Génie des procédés
	LE COZE	Jean	Matériaux
	LOWYS	Jean-Pierre	Physique
	MAGNIN	Thierry	Matériaux
	MATHON	Albert	Gestion
	PEROCHE	Bernard	Informatique
	PLA	Jean-Marie	Mathématiques
	RIEU	Jean	Matériaux
	SOUSTELLE	Michel	Génie des procédés
	VAUTRIN	Alain	Mécanique et Matériaux

## PROFESSEUR DE 2ème CATEGORIE

MM.	DI BENEDETTO	Dominique	Génie des procédés
	PRADEL	Jean	Sciences humaines
	TOUCHARD	Bernard	Physique Industrielle

## DIRECTEURS DE RECHERCHE

MM.	DRIVER	Julian	Matériaux
	GUILHOT	Bernard	Génie des procédés
	THEVENOT	François	Génie des Matériaux

## MAITRES DE RECHERCHE

MM.	COURNIL	Michel	Génie des procédés
	GIRARDOT	Jean-Jacques	Informatique
	GRAILLOT	Didier	Ingénieur RHEA
	GUY	Bernard	Géologie
	KOBYLANSKI	André	Matériaux
	LANCELOT	Francis	Génie Industriel
	MONTHEILLET	Frank	Matériaux
	PIOLAT	Christophe	Génie des procédés
	THOMAS	Gérard	Génie des procédés
	TRAN MINH	Cahn	Génie Bio-Procédés

## PERSONNALITES HABILITEES OU DOCTEURS D'ETAT

MM.	AIVAZZADEH	Sahram	Mécanique et Matériaux
	BIGOT	Jean-Pierre	Génie Bio-Procédés
	BRODHAG	Christian	Matériaux
	DECHOMETS	Roland	Stratégie du Développement
Mme.	GOEURLOT	Dominique	Matériaux
MM.	LONDICHE	Henry	Génie Industriel-Biotechnologie
Mme.	PIOLAT	Michèle	Génie des procédés

## PERSONNALITES EXTERIEURES A L'ECOLE AUTORISEES A ENCADRER DES THESES

MM.	BENHASSAINE	Ali	Génie des procédés (Ecole des mines Ales))
	BOURGOIS	Jacques	Génie Industriel-Biotechnologie (Univ St Etienne)



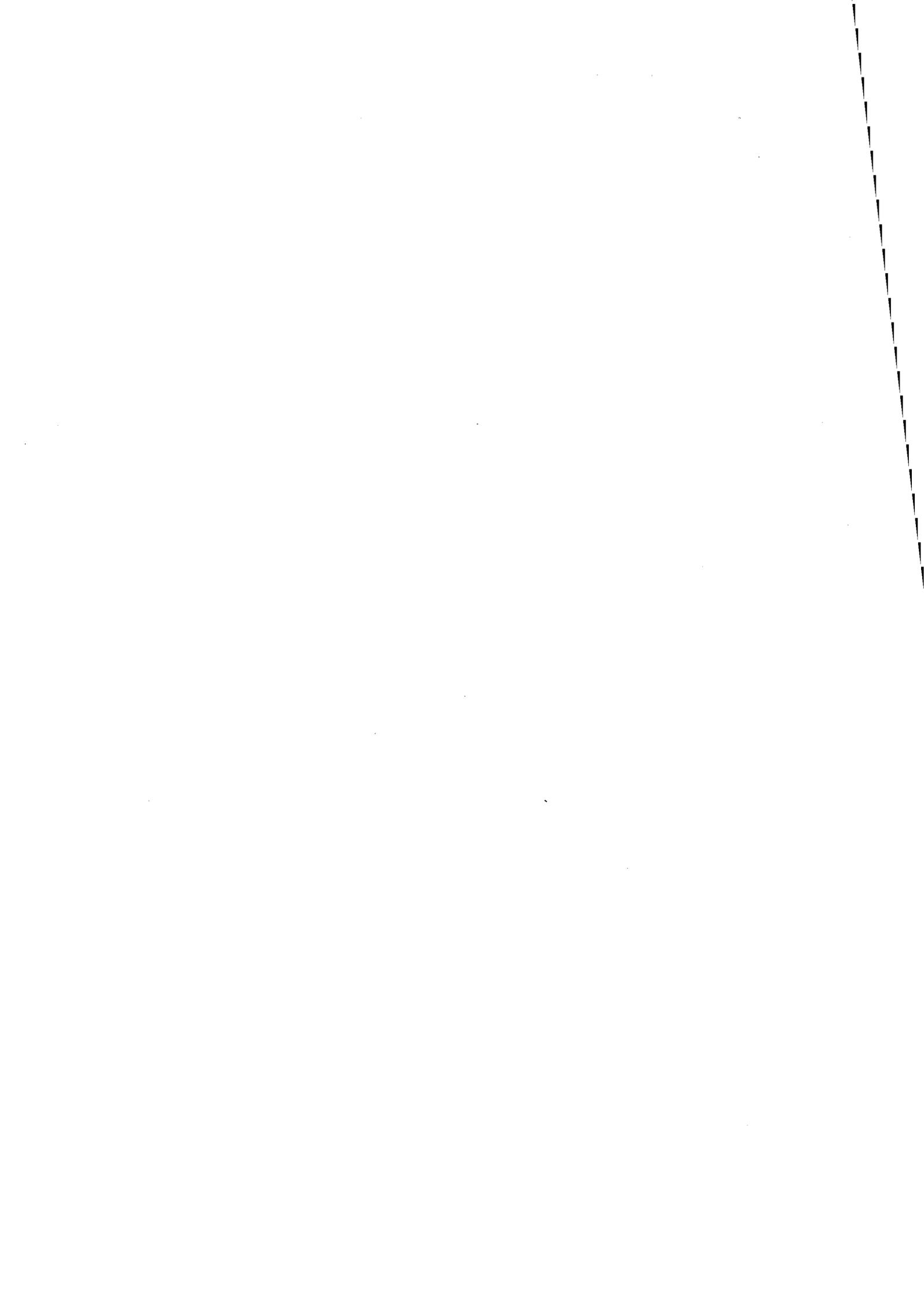
"Déjà nous avons peine à nous représenter les réalités terrestres,  
même ce qui est à notre portée, nous le découvrons avec effort.  
Mais les réalités célestes, qui les a explorées ? Et ta volonté, qui donc l'aurait connue,  
si tu n'avais donné toi-même la Sagesse et envoyé d'en haut ton Saint Esprit ?"

*Du Livre de la Sagesse 9, 16-17.*

*À mes parents*

*À ma femme*

*À mes enfants*



Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury de cette thèse:

**Monsieur Le Professeur Michel Juvet** d'avoir soutenu ce travail et pour son engouement communicatif concernant la recherche sur le sommeil paradoxal.

**Monsieur le Docteur Raymond Cespuglio** qui m'a guidé et encouragé par son enthousiasme et ses qualités scientifiques.

**Madame Le Professeur Arlette Chéruy** qui en me faisant l'honneur de participer au jury apporte sa caution scientifique à ce travail.

**Monsieur le Docteur Canh Tran-Minh** de m'avoir permis de réaliser cette aventure dont la présente thèse en est le fruit.

**Monsieur le Docteur Pierre Laporte** à qui j'exprime toute mon amitié et ma reconnaissance pour m'avoir initié à la recherche scientifique.

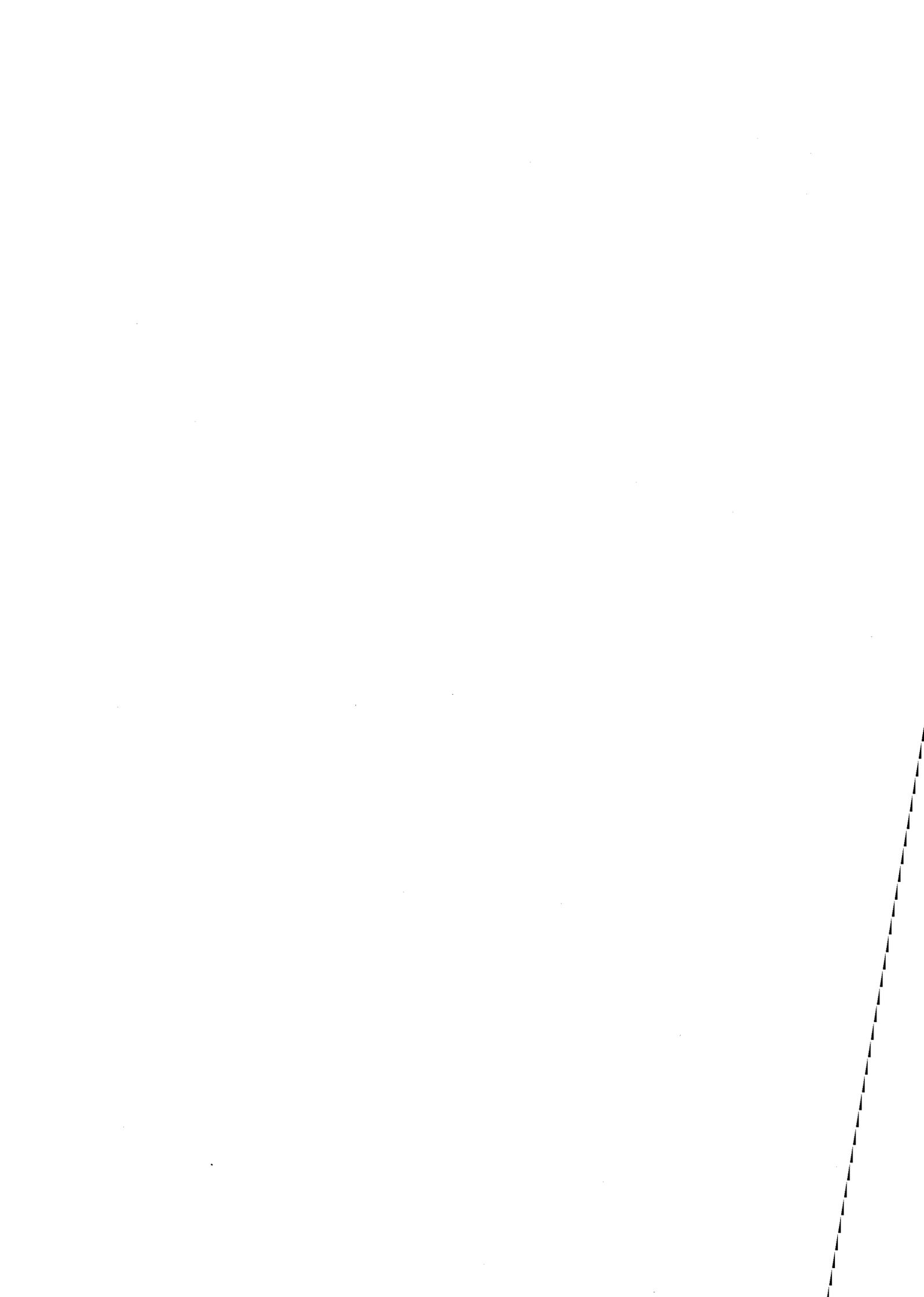
**Monsieur le Docteur Jacques Viret** qui en prenant part au jury, a accepté d'examiner et de critiquer ce travail.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur J.P. Goure et aux membres du Laboratoire TSI au sein duquel la partie du travail expérimental a été réalisée.

Je remercie tout particulièrement toute l'équipe de Pierre Laporte qui m'a accueilli si chaleureusement.

Je remercie les membres de l'équipe de Raymond Cespuglio pour leur aide et leur sympathie.

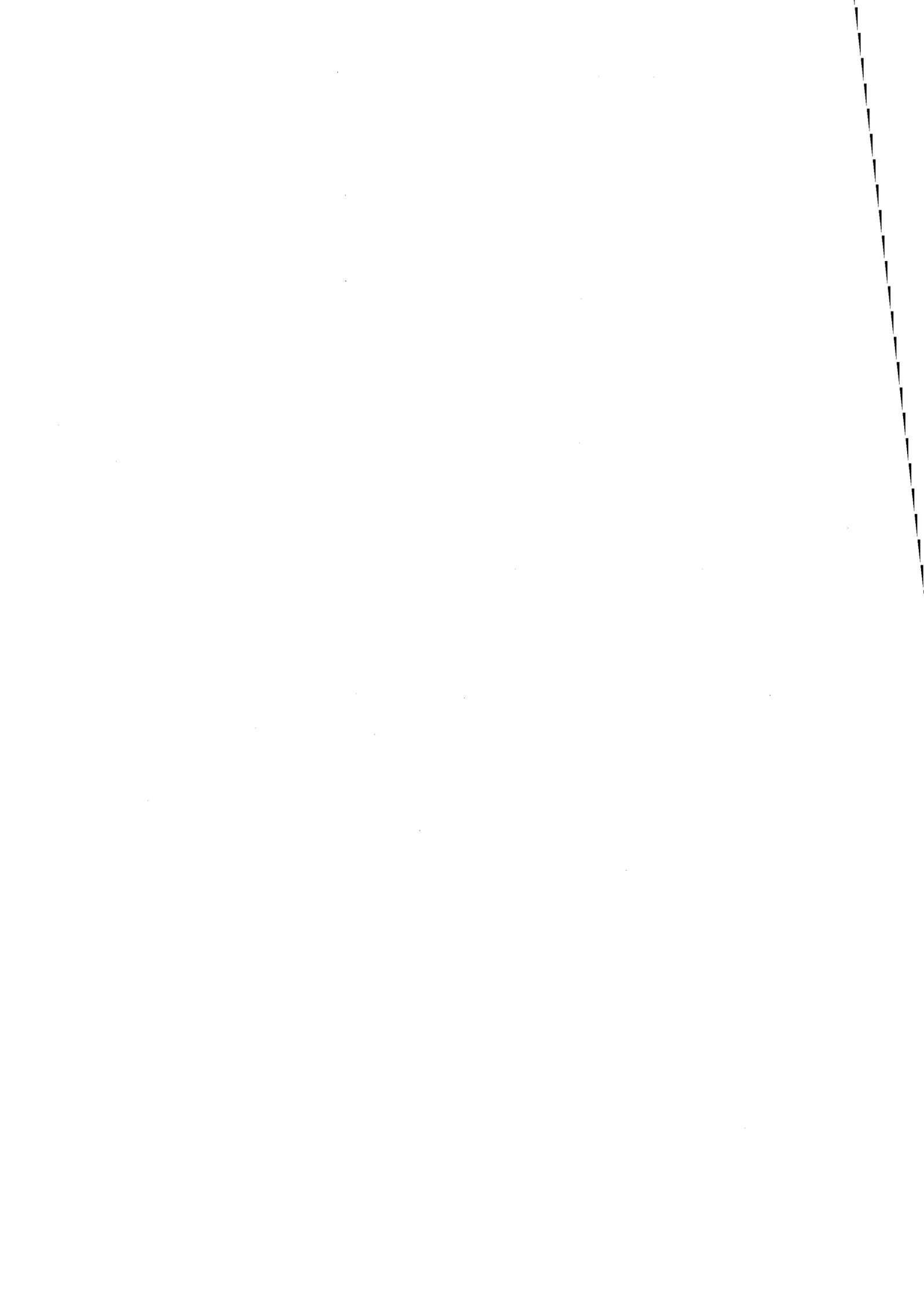
Je tiens enfin à remercier l'École des Mines de Saint-Etienne pour son soutien financier ainsi qu'au Laboratoire CPPI et tout spécialement aux membres de l'équipe de Canh Tran-Minh pour leur soutien et leur amitié.



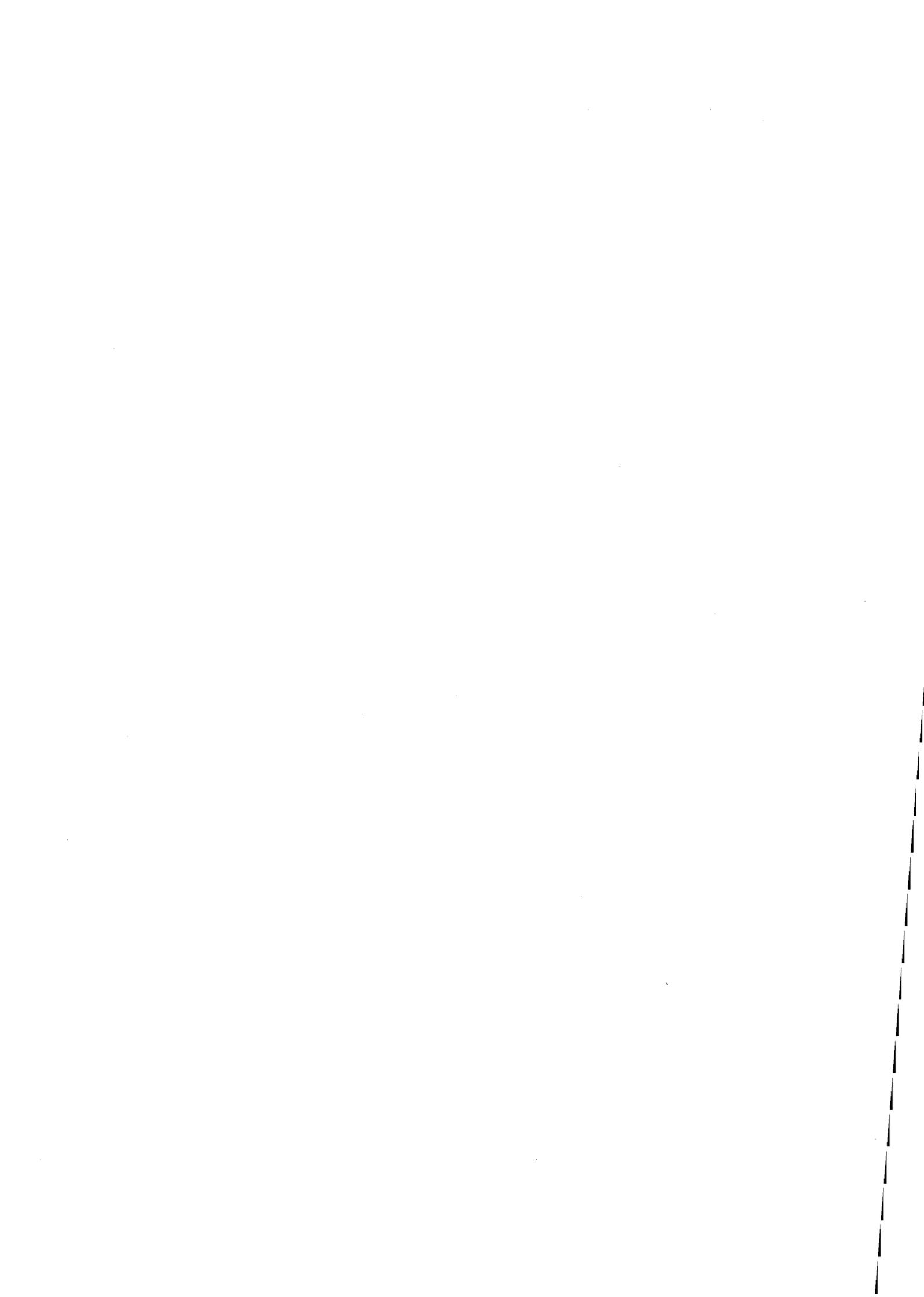
## **SOMMAIRE**



<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>1</b>
<b>I. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>9</b>
I.A. Méthodes.....	9
I.A.1. Généralités sur l'interaction matière lumière.....	9
I.A.2. Méthodes d'analyse de la fluorescence.....	17
I.A.3. Utilisation de ces méthodes.....	24
I.B. Matériel.....	33
I.B.1. Choix des techniques et des méthodes de la FRT domaine temporel .....	33
I.B.2. Instrumentation (l'ensemble).....	37
I.B.3. Traitement du signal.....	49
I.B.4. Théorie du FOCS monobrin en RFF.....	53
I.B.5. Appareils auxiliaires utilisés au cours de ce travail .....	56
<b>II. MESURE IN VITRO DE LA 5-HT</b>	<b>61</b>
II.A. Introduction.....	61
II.A.1. Rappels concernant la 5-HT in vivo .....	62
II.B. Propriétés photophysiques de la 5-HT .....	66
II.B.1. Généralités sur les 5-OHs.....	66
II.B.2. Rappels sur les notations 1La et 1Lb.....	66
II.B.3. Spectre d'absorption expérimental .....	69
II.B.4. Calcul théorique du spectre électronique de 5-HT et 5-HIAA.....	71
II.B.5. Conclusion sur l'absorption de la 5-HT et du 5-HIAA.....	80
II.B.6. Spectre d'émission de la 5-HT .....	80
II.B.7. Conclusion sur la fluorescence de la 5-HT .....	91
II.C. Capteur chimique à fibre optique par FRT.....	93
II.C.1. Mesure en cuvette sans FO d'un standard: PPO.....	93
II.C.2. Mesure en cuvette sans FO de la 5-HT et du 5-HIAA.....	98
II.C.3. Réalisation d'un capteur chimique à fibre optique .....	102
<b>III. MESURE IN VIVO</b>	<b>119</b>
III.A. Analyse des travaux antérieurs .....	119
III.A.1. Développement de capteur chimique à fibre optique (FOCS).....	119
III.A.2. Etat de l'art des FOCS in vivo pour les espèces chimiques d'intérêt clinique .....	120
III.B. Rappels sur la fluorimétrie cérébrale in vivo.....	121
III.B.1. Le NADH .....	121
III.B.2. Rappel du rôle du NAD(P)H .....	122
III.B.3. Distribution du NAD(P)H .....	125
III.B.4. Propriétés photophysiques du NAD(P)H.....	126
III.B.5. La fluorescence du tissu cérébral .....	129
III.C. Le FOCS implanté chez le rongeur en conditions chroniques .....	135
III.C.1. Intérêt premier: étude chimique pendant les diverses phases de la vigilance .....	135
III.C.2. Matériel et Méthode .....	138
III.C.3. Analyse des propriétés photophysiques du tissu cérébral .....	141
III.D. Applications du FOCS implanté.....	157
III.D.1. Etude de la variation du niveau du NADH en fonction des états de vigilance .....	157
III.D.2. Etude de la variation du niveau du NADH lors de la mort de l'animal .....	164
III.D.3. Expériences pharmacologiques chez l'animal libre non anesthésié.....	166
<b>IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>173</b>
Conclusions.....	173
Perspectives.....	173
Annexe .....	178
Aspect technique.....	178
Aspect appliqué .....	179
Microcapteur semi-intrinsèque à fibre optique .....	181
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>193</b>



## Abbreviations, symboles et glossaires



---

ABRÉVIATIONS UTILISÉES EN BIOLOGIE:

3V .....	3e ventricule
5-HIAA .....	5-hydroxyindolacétique acide
5-HT .....	5-hydroxytryptamine
5-MIAA.....	5-methoxyindoleacétique acide
5-MT .....	5-méthoxytryptamine
5-OH.....	5-hydroxyindoles (classe de composés)
ADP .....	Adénosine DiPhosphate
ATP .....	Adénosine TriPhosphate
CBF.....	Cerebral Blood Flow
Cx .....	Cortex
EEG .....	Électro-encéphalogramme
EMG .....	Électro-myogramme
HPLC.....	High Pressure Liquid Chromatography
NAD.....	Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide
NADH .....	Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide Hydroxylé
nRD .....	Noyau raphé dorsalis
PGO.....	Ondes ponto-géniculo-occipitales
PS .....	Paradoxical Sleep (sommeil paradoxal)
SNC.....	Système nerveux central
SWS.....	Slow Wave Sleep (sommeil lent)
W .....	Waking (éveil)

---

ABRÉVIATIONS UTILISÉES EN PHYSIQUE:

FO .....	Fibre Optique
FOCS .....	Fiber Optic Chemical Sensor (capteur chimique à FO)
FRF .....	Fonction Réponse de la Fluorescence
FRPM.....	Fluorescence Résolue en Phase et Modulation
FRT .....	Fluorescence Résolue dans le Temps
HOMO .....	Highest Occupied Molecular Orbital (OM la plus haute occupée)
IRF.....	Instrumental Response Function (Fonction Réponse Instrumentale)
LUMO .....	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (OM la plus basse inoccupée)
PM.....	PhotoMultiplieur
OM .....	Orbitale Moléculaire
RFF .....	Remote Fiber Fluorometry (fluorométrie à distance par fibre optique)
SD .....	Standard Deviation (déviatiion standard)
SNR.....	Signal to Noise Ratio (rapport signal sur bruit)
SPE.....	Single PhotoElectron (Photo-électron Unique)
TC.....	Temps de Collection
TCSPC.....	Time Correlated Single Photon Counting (comptage de photon életron unique)

SYMBOLES ET UNITÉS

<b>Symboles</b>	<b>nom</b>	<b>unité</b>
$A_{j \rightarrow i}$	coefficient d'Einstein d'émission spontanée	$s^{-1}$
$B_{i \rightarrow j}$	coefficient d'Einstein d'absorption	$m.kg^{-1}$
$B_{j \rightarrow j}$	coefficient d'Einstein d'émission stimulée	$m.kg^{-1}$
$C$	concentration	$mole.l^{-1}$
$\epsilon$	facteur d'extinction	$mole^{-1}.l.cm^{-1}$
$\vec{\epsilon}$	champ électrique	$V.m^{-1}$
$E$	énergie	$eV, J$
$\Phi_F$	rendement quantique	sans dimension
$k_i$	constante de vitesse	$s^{-1}$ ou $M^{-1} s^{-1}$
$\lambda$	longueur d'onde	$nm$
$\tau$	temps de déclin de fluorescence	$ns$
$V$	nombre de mode	sans dimension
$\nu$	fréquence	$Hz$
$\bar{\nu}$	nombre d'onde	$cm^{-1}$
$f$	force d'oscillateur	sans dimension
$\vec{\mu}$	moment dipolaire	$C.m$

**GLOSSAIRE:**

déshydrogénases:

les déshydrogénases sont des enzymes qui permettent l'extraction d'hydrogène à partir d'un substrat.

transducteur:

élément d'interface, de conversion et support entre le signal (ou la quantité) à mesurer et le signal effectivement mesuré.

extrinsèque (capteur extrinsèque):

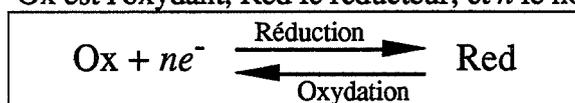
le capteur utilise le transducteur de manière passive (contraire d'intrinsèque).

intrinsèque (capteur intrinsèque):

le capteur utilise une propriété physico-chimique du transducteur pour réaliser la mesure.

oxydo-réduction:

Ox est l'oxydant, Red le réducteur, et  $n$  le nombre d'électron



Un réducteur cédant des électrons est oxydé.

SD:

$$\text{SD} = \sqrt{\text{variance}}$$

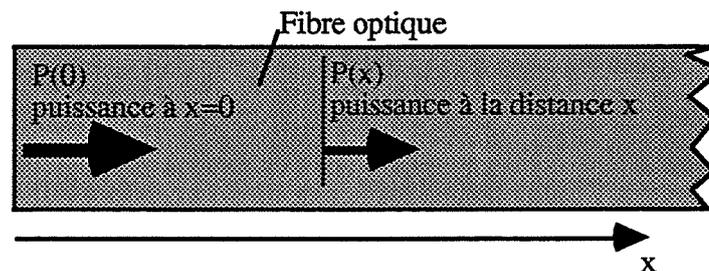
variance:

$$\text{variance} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \text{ avec } n \text{ mesures et } \bar{x} \text{ la moyenne de la mesure.}$$

## GLOSSAIRE SUR LES FIBRES OPTIQUES:

**Atténuation:**

Diminution de la puissance lumineuse dans une fibre optique par absorption et par diffusion du matériau qui constitue le cœur.



L'atténuation est caractérisée par le coefficient d'atténuation  $\alpha$ , tel que  $P(x)=P(0) 10^{-\alpha x/10}$  avec  $\alpha$  en dB/Km et  $x$  en Km.

**Cœur:**

Partie centrale de la fibre d'indice de réfraction supérieur, dans laquelle est transmise la lumière.

**Excimère:**

Contraction de "excited dimer".

**Gaine ("cladding"):**

Partie de la fibre entourant le cœur, d'indice de réfraction inférieur, servant à maintenir la lumière dans le cœur.

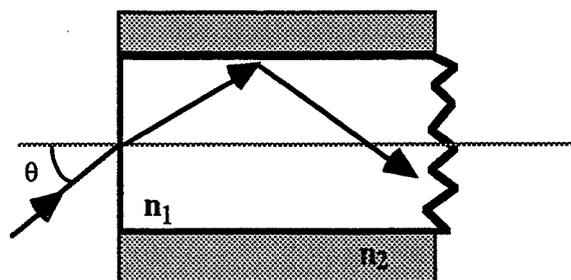
**Modes:**

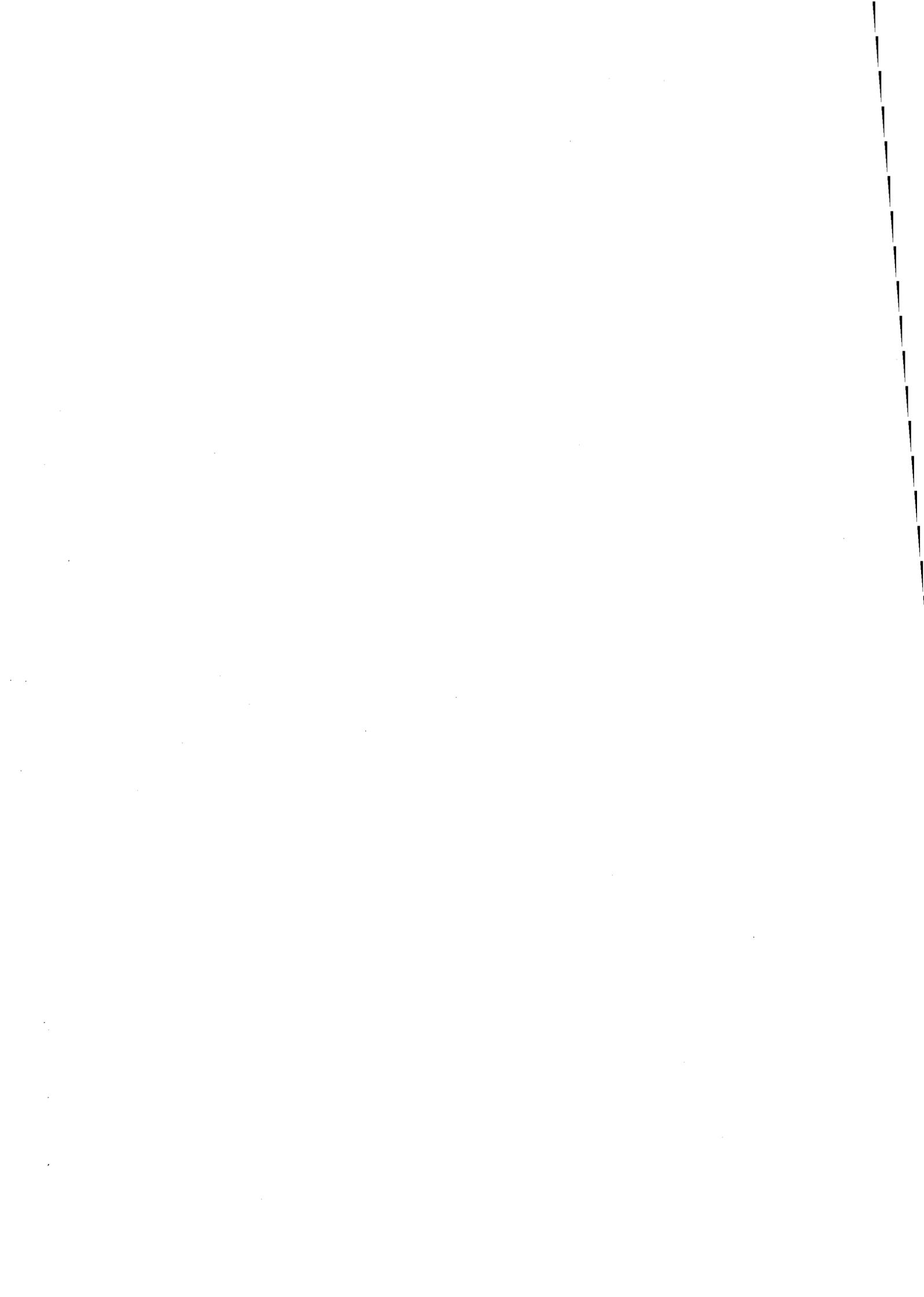
Un mode correspond à un type de rayon lumineux propagé; monomode signifie qu' un seul mode est guidé.

**Ouverture numérique (fibres à saut d'indice):**

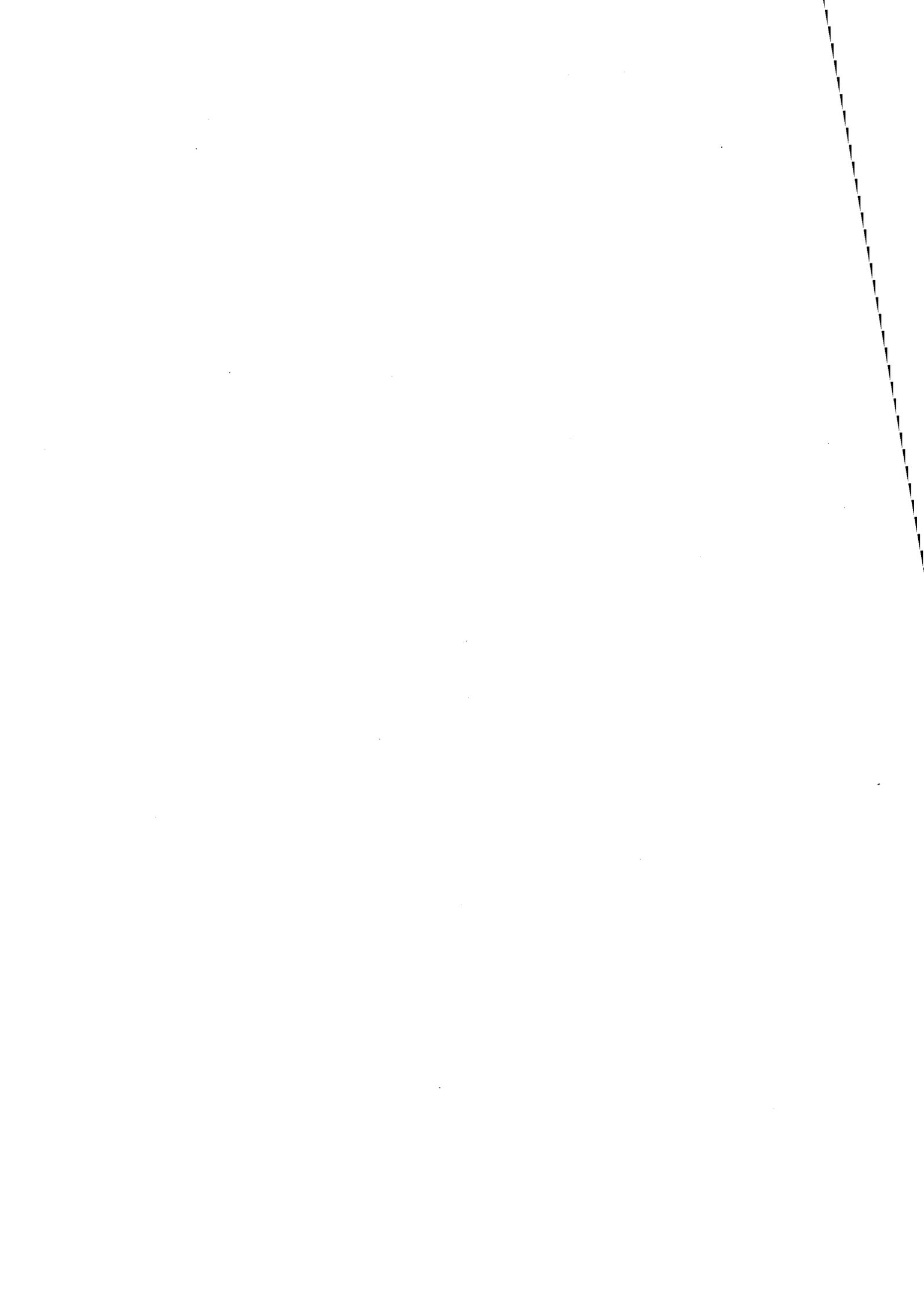
$n_N$  est le sinus de l'angle  $\theta$ .  $2\theta$  est l'angle d'acceptance de la fibre, c'est-à-dire que les rayons entrant dans ce cône sont guidés par la fibre.

$n_N = \sin \theta = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$  avec  $n_1$  et  $n_2$  les indices de réfraction respectifs du cœur et de la gaine.





# INTRODUCTION GÉNÉRALE



---

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

La recherche développée concerne la mise au point d'un **capteur chimique à fibre optique (FOCS)** permettant la mesure résolue en temps et en longueur d'onde, de la **fluorescence** induite par excitation laser et émise par des substances présentes dans le tissu cérébral du rat non anesthésié. Ces mesures sont aussi combinées avec la polygraphie classique (ensemble instrumental permettant la réalisation d'électroencéphalogramme) afin de pouvoir corrélérer leurs fluctuations avec l'état de **vigilance de l'animal**.

Les divers axes de la recherche proposée sont à l'interface entre le domaine de l'instrumentation relative aux microcapteurs chimiques et l'aspect neurobiologique des mécanismes neurochimiques qui sous-tendent l'alternance éveil-sommeil. Les nombreuses questions soulevées à ce jour par les résultats des expériences afférentes à cette thématique, ainsi que le souci de la recherche d'une nouvelle perspective technique pour y répondre, sont à la base du présent projet.

Il est vrai pour toute discipline scientifique que la progression du niveau des connaissances est étroitement liée aux performances des outils utilisés. L'évolution de la compréhension des mécanismes du cycle veille-sommeil, illustre bien cet aspect des choses. L'introduction de l'électroencéphalographie dans les années 30 a permis une quantification objective des états de vigilance. Par la suite, la réalisation de lésions, de stimulations au sein du cerveau ont permis la localisation des structures impliquées dans la genèse de l'éveil (**W**) ou du sommeil. La mise au point des techniques d'histofluorescence et l'apport de la pharmacologie ont été aussi déterminant puisque parallèlement à l'identification de certaines substances biochimiques au sein du cerveau, il a été possible d'agir sur leur synthèse, leur dégradation, ou les récepteurs affectés dans la transmission d'un message biochimique.

Dans ce contexte et à travers l'usage de ces différents outils, la **Sérotonine (5-HT)**, une amine identifiée dans les groupes cellulaires du système du raphé, a pu être suggérée comme le neurotransmetteur directement responsable du **sommeil lent (SWS)** et du déclenchement du **sommeil paradoxal (PS)**. En effet l'inhibition de sa synthèse par la p.chlorophénylalanine (PCPA) induit une insomnie totale qui est accompagnée par une diminution de son contenu endogène et de son immunofluorescence tissulaire évalués *post-mortem*. L'administration secondaire de 5-HTP (5-Hydroxytryptophane), le précurseur immédiat de la 5-HT qui est rapidement transformé en Sérotonine et restaure selon une relation dose effet l'ensemble des paramètres évoqués ci-dessus [Jouvet,1969]. Ces faits expérimentaux, solidement établis, n'ont cependant pas résisté aux tests sévères imposés par l'usage d'outils nouveaux.

Dans ce sens, la mise au point de la technique de micro-électrode chez l'animal en conditions chroniques (mesure de l'activité électrique d'un seul neurone) a permis de mettre en évidence, contrairement à ce qui était attendu, que les neurones sérotoninergiques sont actifs pendant l'éveil et que leur activité diminue pendant le SWS pour être totalement nulle pendant le PS [McGinty,1976].

Comment concilier qu'un réseau de neurones qui doit sécréter de la 5-HT pendant le sommeil soit totalement inactif du point de vue électrique pendant cet état de vigilance?

L'apport de cet outil soulignait sans ambiguïté que le niveau de compréhension des mécanismes neurochimiques du sommeil était insuffisant. Pour une meilleure conception du rôle de la 5-HT et pour dépasser les contradictions soulevées par les techniques successivement utilisées, la mise au point d'outils plus performants que ceux disponibles s'avérait de nouveau nécessaire. Dans ce contexte expérimental, la réalisation d'un outil permettant la mesure de la libération de la 5-HT, la voltamétrie, a été entreprise au début des années 80 [Cespuglio,1983]. Le principe de cette méthode consiste dans la mesure du courant d'oxydation produit par des substances oxydables et consécutif à l'application d'un potentiel variable. Ainsi, pour une valeur donnée du potentiel appliqué, une seule classe de composés s'oxydent (en l'occurrence les composés 5-Hydroxyindols (5-OH)). Chez l'animal en conditions physiologiques, la mesure provient essentiellement du métabolite de la 5-HT, le 5-HIAA (5-Hydroxyindolacétique acide). Enfin, la méthode de dialyse intracrânienne ne donne pas non plus entière satisfaction pour la mesure des variations de la 5-HT à travers le cycle veille-sommeil; dans ce sens, les délais temporels qui existent entre chaque mesure (15 min) sont trop importants, la résolution anatomique est trop faible (>1 mm).

A ce stade expérimental et afin de progresser dans la compréhension des régulations qui assurent l'alternance du cycle éveil-sommeil, les questions suivantes, toutes attachées à la réalisation de progrès techniques, restent posées:

 Bien qu'il soit possible de mesurer un signal voltamétrique qui renseigne sur la libération de la 5-HT, ce n'est pas ce transmetteur qui est mesuré directement. **Existe-t-il une technologie alternative permettant sa mesure directe avec une sensibilité et une sélectivité adéquates ainsi que des délais temporels brefs entre chaque mesure?**

 Parmi les multiples mécanismes qui induisent ou régulent le sommeil, il est connu que les facteurs hypnogènes en conjonction avec la 5-HT jouent un rôle important; la plupart de ces facteurs sont de nature peptidergique. Au delà de ces composés, les neurotransmetteurs comme l'Acétylcholine et le GABA interviennent dans les mécanismes du sommeil et de l'éveil. **Pour tous ces composés, existe-t-il une technologie permettant une mesure directe?**

☞ Au delà des possibilités de mesurer directement ces différents corps, l'alternance veille-sommeil dépend aussi de mécanismes énergétiques nécessitant (voie du Pyruvate) ou non (voie du Lactate) la présence d'oxygène. Un capteur permettant de mesurer l'oxygène ou le niveau du métabolisme serait d'un grand intérêt.

Afin de pouvoir adopter une solution technique à ces questions, l'opération tout à fait nouvelle de la mise au point d'un capteur chimique à fibre optique a été entreprise.

En utilisant les dernières évolutions de l'instrumentation des microcapteurs chimiques, un équipement de base afférent à ce capteur a été développé grâce à la collaboration de 3 équipes:

- Laboratoire de Biotechnologie, École des Mines de St-Etienne,
- Laboratoire T.S.I., URA CNRS 842, Univ. J. Monnet, St-Etienne,
- Laboratoire de Médecine Expérimentale, INSERM U52, Lyon.

Un tel équipement a permis la mesure *in vitro* de la 5-HT et la détection *in vivo* au niveau du cortex (Cx) et du noyau du raphé dorsalis (nRD) d'une fluorescence émise à 460nm et dépendante du NADH endogène chez le rat non anesthésié et libre de tous mouvements. La mesure du NADH, consécutive des contraintes techniques (laser azote n'émettant qu'à une seule longueur d'onde), s'avère être une possibilité intéressante. Associée à la polygraphie, la mesure du NADH endogène pourrait permettre l'évaluation de la nature du métabolisme (oxydatif ou non) qui accompagne les états de vigilance.

La mesure *in vitro* de la 5-HT est aussi acquise (fluorescence émise vers 400 nm) mais certaines contraintes techniques ont imposé une limite de détection de l'ordre du  $\mu\text{M}$  au stade actuel de développement alors que la concentration extracellulaire *in vivo* de la 5-HT est d'environ 1nM. Cependant par divers moyens techniques il semble raisonnable d'envisager à moyen terme d'aborder la mesure *in vivo* de cette amine, de l'acétylcholine et de l'oxygène, par un FOCS semi-intrinsèque en association avec la détection polygraphique des états de vigilance.

La rédaction de ce travail dont les motivations viennent d'être explicitées, s'articule sur 4 chapitres:

Le CHAPITRE I concerne la conception et la réalisation d'un FOCS, l'instrumentation associée est aussi décrite.

Le CHAPITRE II présente la mesure *in vitro* par ce FOCS d'un neuromédiateur, la sérotonine (5-HT) et de son métabolite, l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA).

Les propriétés photophysiques de la 5-HT sont rapportées: un état émissif de la 5-HT non décrit par la littérature a été mis en évidence. L'ordre de grandeur de la limite de détection de 5-HT est de 5  $\mu$ M.

L'utilisation d'un laser émettant dans la gamme 300-325 nm pourrait permettre d'atteindre une meilleure limite de détection de cette amine.

Les avantages de la méthode de fluorescence résolue dans le temps (FRT) en chimie analytique sont enfin présentés.

Le CHAPITRE III aborde les résultats obtenus *in vivo* au niveau du cortex (Cx) et du noyau du raphé dorsalis (nRD) chez le rat libre de ses mouvements.

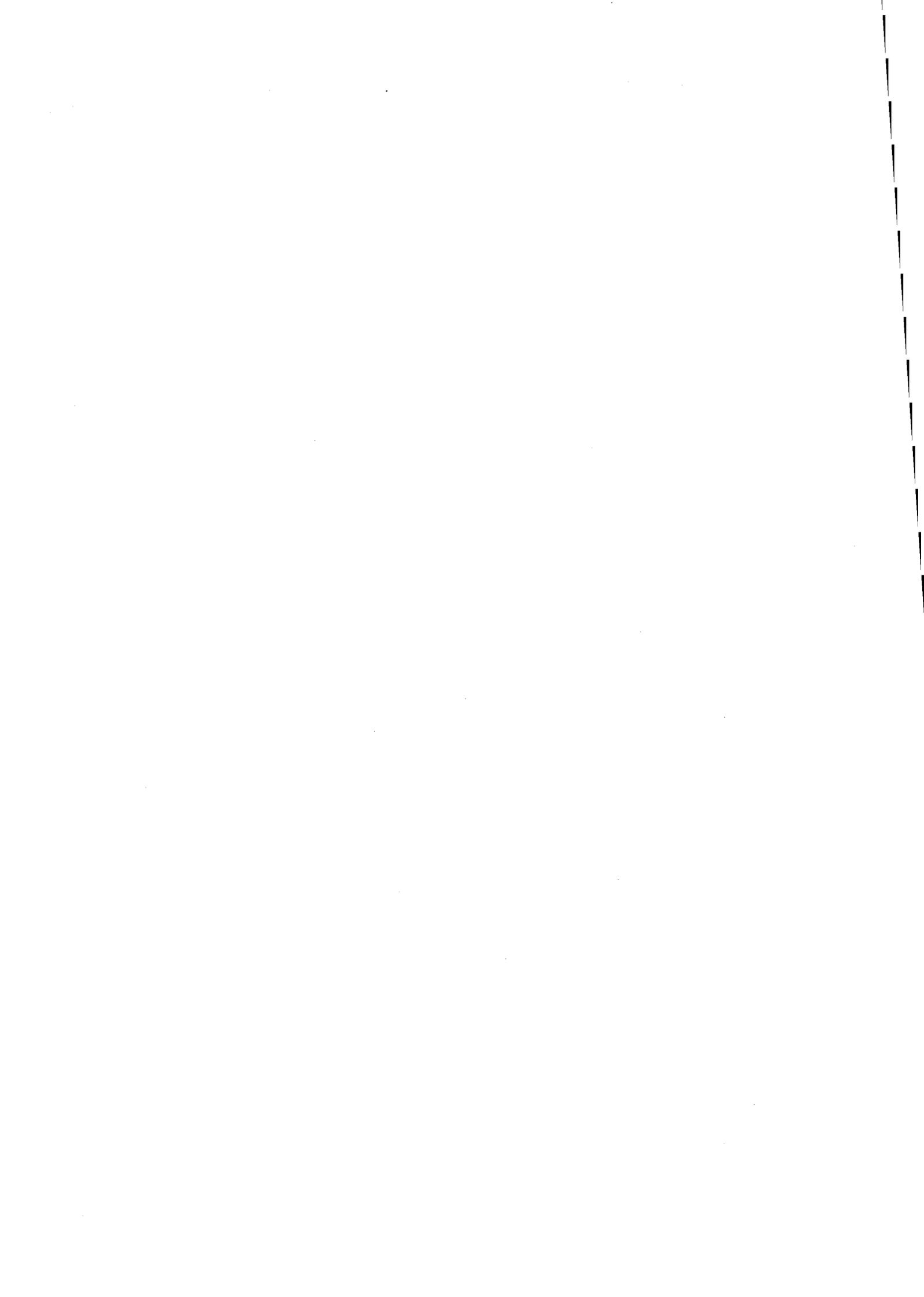
Deux pics ont été déterminés: un situé à 390 nm et l'autre centré sur 460 nm. Le premier pic (390 nm) n'a pas encore d'attribution moléculaire sûre. Nos données spectroscopiques et celles de la littérature sur l'autofluorescence des tissus cérébraux du pic mesuré à 460nm permettent cependant une attribution moléculaire plus fiable (NADH endogène).

Quelques résultats préliminaires ont été obtenus avec le FOCS implanté dans deux structures cérébrales (Cx et nRD) pendant les divers états de vigilance. Au niveau de la partie antérieure et ventrale du nRD, une augmentation de la fluorescence (460 nm) a été observée lors du sommeil à ondes lentes (SWS) et du sommeil paradoxal (PS). Au niveau du Cx une phénoménologie inverse semble exister.

En outre une augmentation importante et très rapide de la fluorescence (460nm) a été mesurée lors de la mort de l'animal.

En CONCLUSION nous présentons l'essentiel de notre recherche sur les nouveaux capteurs appliqués aux neurosciences. En final nous suggérons quelques possibilités expérimentales permettant des développements pertinents et prometteurs de l'appareillage.

**Chapitre I:**  
**MATÉRIEL ET MÉTHODES**



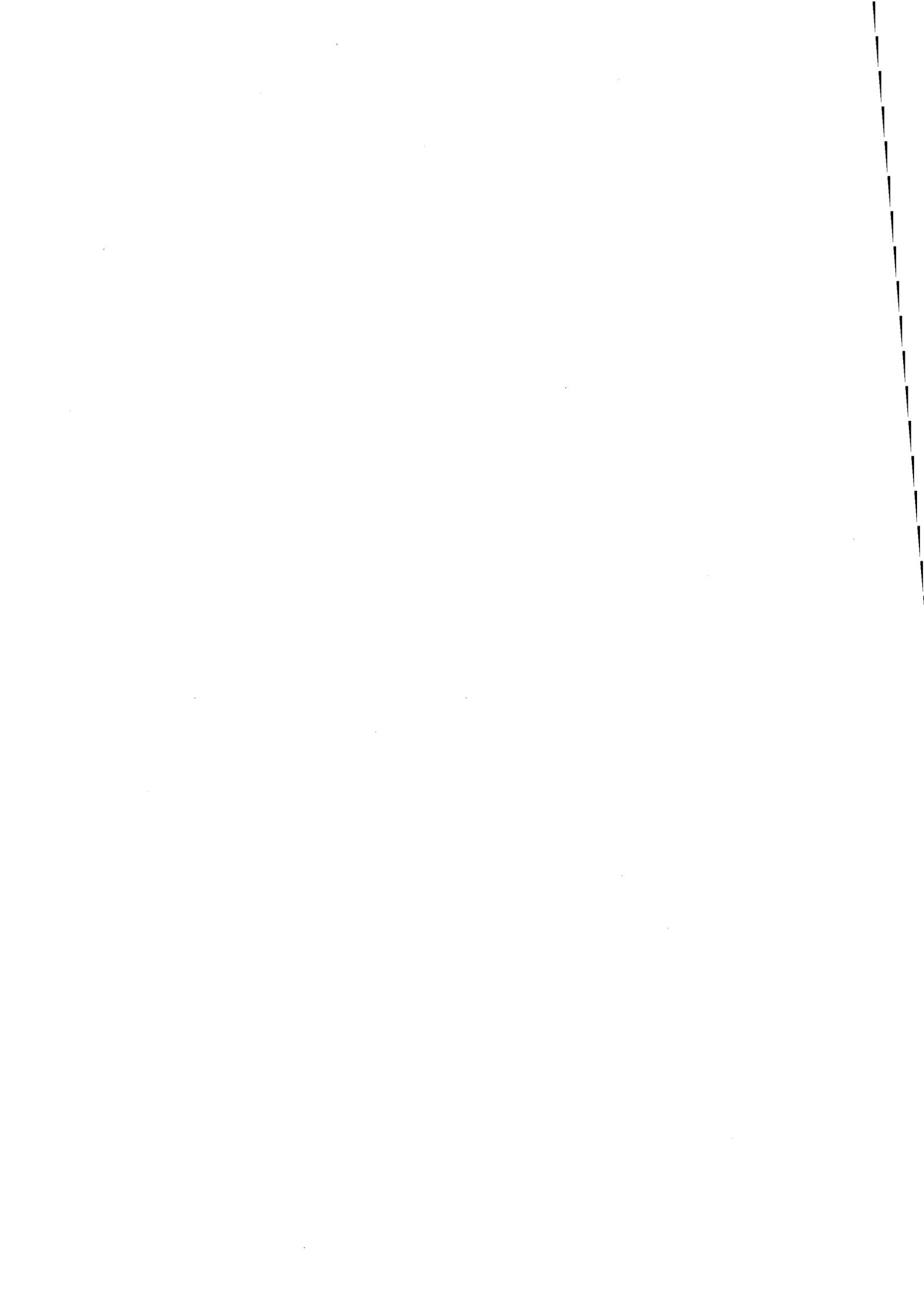
---

## RÉSUMÉ

En premier lieu, certaines grandeurs largement utilisées dans nos travaux en absorption (force d'oscillateur:  $f$ ) et en fluorescence (temps de déclin de fluorescence:  $\tau$ ) sont rappelées.

L'instrumentation et les méthodes d'analyse en fluorescence sont ensuite comparées en vue de la conception et de la réalisation d'un capteur chimique à fibre optique (FOCS).

Enfin sont présentés le FOCS, l'appareillage associé et le traitement du signal développé. Le FOCS est un capteur extrinsèque monobrin et monofibre qui met en œuvre une fluorescence résolue dans le temps induite par laser azote subnanoseconde.



# I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

## I.A. Méthodes

### I.A.1. Généralités sur l'interaction matière lumière

#### I.A.1.a. Introduction

La Figure I-1 présente le diagramme de Jablonski [Berlman,1971]. Les niveaux d'énergie de l'état de base sont notés  $S_0$  et ceux des états excités successifs sont notés  $S_i$ . Les états vibrationnels et rotationnels n'y figurent pas par soucis de simplicité. Une molécule en solution est généralement dans son état singulet fondamental  $S_0$  à la température ambiante. Les différences énergétiques des niveaux impliqués dans les transitions électroniques sont de l'ordre de 2 à 5 eV ( $1 \text{ eV} \approx 8066 \text{ cm}^{-1}$ ). Alors que les différences mises en jeu dans les transitions vibrationnelles et rotationnelles sont respectivement de l'ordre de 0.1 eV et 0.01 eV. La molécule soumise à une illumination d'énergie appropriée peut passer à un état excité  $S_i$  en un temps de l'ordre de  $10^{-15}$ s. La désactivation peut s'effectuer de plusieurs façons schématisées sur le diagramme de Jablonski (Figure I-1). Ces différents modes de relaxation s'effectuent dans des gammes de temps allant de  $10^{-14}$  à  $10^{-8}$  s [Fleming,1990].

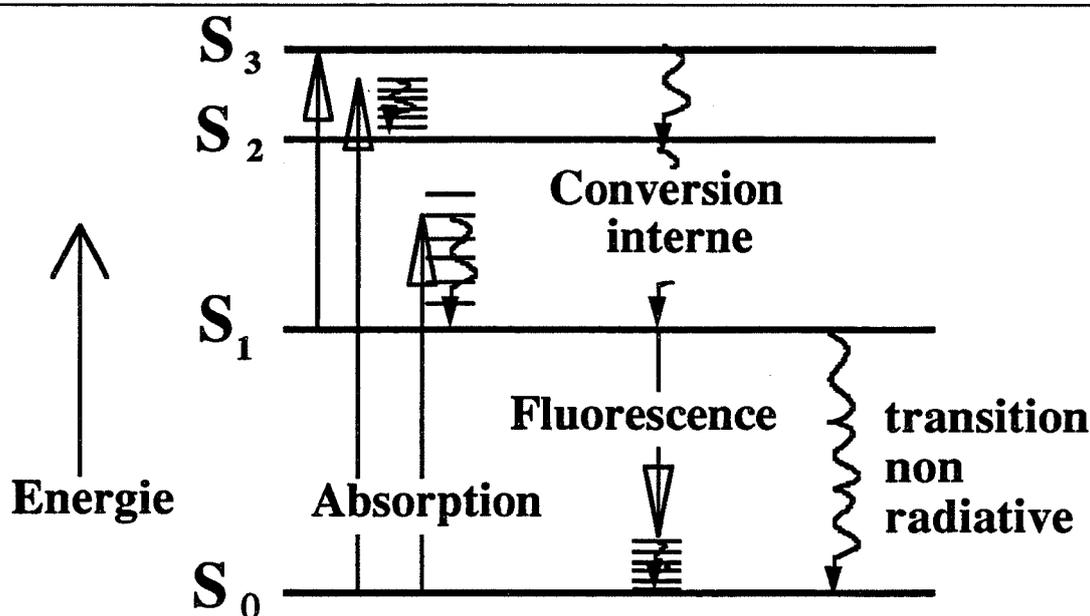


Figure I-1:  
Diagramme de Jablonski simplifié

### I.A.1.b. Généralités sur l'absorption

Rappelons brièvement quelques généralités relatives à l'absorption d'une onde électromagnétique (de fréquence  $\nu$  exprimée en Hz, d'énergie  $\bar{\nu} = \nu/c$  en  $\text{cm}^{-1}$  ou de longueur d'onde  $\lambda = 1/\bar{\nu}$  en nm) dont l'ensemble de la théorie est abordée en détail notamment dans les références suivantes [Kauzman,1957], [Birks,1970].

#### I.A.1.b.i. Les paramètres physiques de l'absorption

Voyons maintenant quelques paramètres importants:

☞ **I**, la variation de l'intensité ( $I$ ) de la lumière après avoir traversé une longueur  $dx$  d'un liquide contenant  $C$  mole/l de corps absorbant est égale à  $dI = -k I dx = -\alpha C \lambda dx$ . Après intégration on obtient la loi de Beer Lambert:

$$I = I_0 10^{-\epsilon C \lambda}$$

$I_0$  étant l'intensité de la lumière avant l'absorption,  $\epsilon$  le facteur d'extinction moléculaire en  $\text{Mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $\epsilon = \alpha / 2.3 = k / (2.3 C)$ ),  $C$  la concentration en  $\text{Mole} \cdot \text{l}^{-1}$  et  $\lambda$  l'épaisseur de la couche absorbante en cm.  $\epsilon C \lambda$  est encore appelé absorbance ou densité optique.

☞ **A**, est utilisé dans les cas où l'absorption s'étale sur un domaine de fréquence:

$$A = \int \epsilon_{\nu} d\bar{\nu}$$

☞ **f**, une autre grandeur que que l'on emploie pour caractériser l'intensité d'absorption est la **force d'oscillateur f**. Pour décrire l'absorption d'une onde électromagnétique par un milieu de  $N$  dipôles par unité de volume (formés d'électrons élastiquement liés pour la théorie classique) et contenant  $n$  molécules par unité de volume, ces atomes possédant une fréquence propre  $\nu_0$ .

Nous supposons que chaque atome est équivalent à  $f$  oscillateurs classiques ( $f$  étant sans dimension), c'est-à-dire que  $N = nf$  [Cagnac,1971]. Plus l'absorption de ces molécules est importante plus  $f$  est grand. L'image classique de l'électron élastiquement lié ne forme qu'un modèle très simple en ne tenant pas compte de la réalité quantique des phénomènes. Dans l'étude quantique si l'unité de volume contient  $n_i$  atomes, immobiles, dans l'état  $i$  d'énergie  $E_i$  (de fonction d'onde  $\Psi_i$ ), pouvant passer à un état  $j$  d'énergie  $E_j$ ,  $E_j > E_i$  (de fonction d'onde  $\Psi_j$ ) en absorbant la radiation de fréquence  $\nu_{ij} = \frac{E_j - E_i}{h c}$  avec  $c$  vitesse de la lumière et  $h$  la constante de Planck ( $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$  J.s [Cohen,1992]),  $f_{ij}$  représente la force d'oscillateur,

associée à l'absorption de la transition  $i \rightarrow j$ , c'est maintenant un nombre non entier et inférieur à un.

Pour une valeur théorique de  $f$  égal à 1, on obtient pour  $\mathcal{A}$ , noté alors  $\bar{\mathcal{A}}$  :

$$\bar{\mathcal{A}} = \frac{Ne^2\pi}{2303 c^2 m} \text{ et donc } \bar{\mathcal{A}} = 2.31 \cdot 10^8 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-2}.$$

avec Charge de l'électron:  $e = 1.602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ , masse de l'électron:  $m = 9.11 \cdot 10^{-31} \text{ Kg}$ , vitesse de la lumière  $c = 2.998 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  et le nombre d'Avogadro  $N = 6.023 \cdot 10^{23} \text{ mole}^{-1}$  [Cohen,1992].

La valeur de  $f_{ij}$  s'exprime alors par le rapport de la valeur expérimentale de  $\mathcal{A}$  par rapport à la valeur théorique  $\bar{\mathcal{A}}$  :  $f = \int \epsilon d\bar{\nu} / \bar{\mathcal{A}}$  ( ce qui donne avec  $\epsilon$  en  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  en  $\text{cm}^{-1}$ ) [Sandorfy,1959], [Kauzman,1957]:

$$f_{ij} = 4.32 \cdot 10^{-9} \int \epsilon d\bar{\nu}$$

Lorsque les bandes se recouvrent en partie, on peut utiliser la formule de Kuhn et Braun [Kuhn,1930], [Sandorfy,1959]:

$$\epsilon = \epsilon_{\max} e^{-\left(\frac{\bar{\nu} - \bar{\nu}_{\max}}{\eta}\right)^2}.$$

Ceci revient à approximer la bande par une courbe de Gauss ( $\bar{\nu}$ ,  $\bar{\nu}_{\max}$  et  $\eta$  étant en  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon$  et  $\epsilon_{\max}$  sont des facteurs d'extinction ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). L'inconvénient majeur de la modélisation de Kuhn et Braun est son caractère symétrique tandis que la formule de Lowry et Hudson [Sandorfy,1959] légèrement plus complexe, donne des modèles de bande descendant avec une pente moins forte vers les longueurs d'onde plus courtes:

$\epsilon = \epsilon_{\max} e^{-\left(\frac{(\bar{\nu} - \bar{\nu}_{\max})/\eta}{(\bar{\nu}_{\max})/\bar{\nu}}\right)^2}$ . Nous utiliserons la formule de Kuhn et Braun pour séparer les bandes qui se chevauchent et pour le calcul de  $f$  d'une transition, on obtient avec  $\epsilon$  en  $\text{mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  et  $\eta$  en  $\text{cm}^{-1}$ :

$$f = 4.32 \cdot 10^{-9} \epsilon_{\max} \eta \sqrt{\pi}.$$

#### I.A.1.b.i. Lien entre la théorie et l'expérience

$f$  est aussi une grandeur qui est utilisée pour la comparaison entre des calculs théoriques d'absorption et des résultats expérimentaux [Atkins,1978], [Gorry,1985].

Définissons maintenant les coefficients d'Einstein:

considérons un système d'atomes enfermés dans une enceinte et un rayonnement de densité spectrale  $\rho(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \frac{1}{e^{\frac{h\nu}{kT}} - 1}$

avec T température absolue K et k la constante de Boltzman.

Pour obtenir un bilan d'équilibre thermodynamique compatible avec la loi de Planck, Einstein introduit les trois processus d'absorption, d'émission spontanée (fluorescence) et d'émission induite ou encore appelée stimulée.

Supposons le système soumis dans son état fondamental  $i$  à ce rayonnement de densité  $\rho(\nu_{ij})$ . La probabilité qu'il absorbe un photon et passe à l'état excité  $j$  par unité de temps sera égale  $B_{i \rightarrow j} \rho(\nu_{ij})$ .  $B_{i \rightarrow j}$  est le coefficient d'absorption d'Einstein.

Le coefficient d'émission spontanée d'Einstein ( $A_{j \rightarrow i}$ ) est la probabilité d'émission d'un photon spontanément par unité de temps. La probabilité d'émission stimulée est donnée par  $B_{j \rightarrow i} \rho(\nu_{ij})$  avec  $B_{j \rightarrow i}$  le coefficient d'émission stimulée d'Einstein.

Le bilan d'équilibre thermodynamique fournit les relations d'Einstein:

$$A_{j \rightarrow i} = 8\pi h \bar{\nu}^3 B_{j \rightarrow i} \quad \text{et} \quad g_i B_{i \rightarrow j} = g_j B_{j \rightarrow i}$$

Initialement ces coefficients ont été appliqués aux spectres de raies mais au vu de leur généralité thermodynamique ils peuvent être appliqués aux spectres de bandes larges en introduisant à la place de  $\bar{\nu}$  :  $\bar{\nu}_{\text{moy}}$ . Dans ce cas ils représentent des valeurs moyennes de probabilité de la transition électronique globale.

Le traitement rigoureux des interactions entre une molécule et un champ électromagnétique exige la connaissance précise, rarement atteinte, de la distribution des charges électroniques dans la molécule. On peut se contenter d'une solution approchée en caractérisant la molécule par un vecteur, son moment électrique. Cette notion est très utile si on considère le système des forces  $\vec{f}$  appliquées à une molécule plongée dans un champ électrique  $\vec{\epsilon}$  et si on assimile cette molécule à un ensemble de charges ponctuelles  $q_i$  (noyau ou électron) de position  $\vec{r}_i$ . La résultante générale de ce système de forces  $\vec{F} = \sum \vec{f}_i = \vec{\epsilon} \sum q_i$  est nulle dans le cas d'une molécule neutre, de sorte que l'action d'ensemble du champ se réduit à un couple caractérisé par le moment résultant :  $\vec{\Gamma} = \sum \vec{r}_i \wedge \vec{f}_i = (\sum q_i \vec{r}_i) \wedge \vec{\epsilon}$  ce qui introduit le moment dipolaire  $\vec{\mu} = \sum q_i \vec{r}_i$ .

L'énergie d'interaction entre un champ électrique et un moment dipolaire est défini par :  $E = - \vec{\mu} \cdot \vec{\epsilon}$ .

En tenant compte de cette énergie et en appliquant la théorie des perturbations dépendant du temps, le problème se ramène à calculer des intégrales du type:  $R_x^{ij} = \int \Psi_i^* M_x \Psi_j dt$  appelée intégrale du moment de transition (où  $M_x$  est la composante suivant  $x$  du moment dipolaire  $\vec{\mu}$  :  $M_x = \sum e_i x_i$  ( $e$  charge de l'électron)) [Gorry, 1985]. Les intégrales du moment de transition sont très importantes car la probabilité d'une transition de  $\Psi_i$  à  $\Psi_j$  est proportionnelle au carré de l'intégrale du moment de transition noté  $|R^{ij}|^2$  ( $|R^{ij}|^2 = |R_x^{ij}|^2 + |R_y^{ij}|^2 + |R_z^{ij}|^2$ ).

$$\text{Ce qui donne : } A_{j \rightarrow i} = \left( \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \right) \frac{64\pi^4 \nu^3}{3hc^3} |R^{ij}|^2 \quad \text{en s}^{-1}.$$

et avec les relations d'Einstein ( $B_{i \rightarrow j} = B_{j \rightarrow i}$  [Berlman, 1971]) on obtient :

$$B_{i \rightarrow j} = \left( \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \right) \frac{8\pi^3}{3h} |R_{ij}|^2 \quad \text{en m. Kg}^{-1}.$$

Or en tenant compte des définitions de  $f$  et de  $B_{i \rightarrow j}$   $f = 4\pi\epsilon_0 \frac{mh\nu}{\pi e^2} B_{i \rightarrow j}$  et

$$f = \frac{8\pi^2 m\nu}{3 h e^2} |R_{ij}|^2$$

Le coefficient  $\frac{8\pi^2 m}{3 h e^2}$  est égal à  $1.41 \cdot 10^{42} \text{ m}^{-2} \text{ s}^1 \text{ C}^{-2}$  ce qui donne

$$f = 4.707 \cdot 10^{-7} \bar{\nu} |R_{ij}|^2 \quad \text{avec } |R_{ij}|^2 \text{ en D}^2 \text{ et } \bar{\nu} \text{ en cm}^{-1}.$$

Il faut insister sur le fait que la probabilité de transition (et donc l'intensité d'absorption) dépend ainsi uniquement des moments de transition  $|R_{ij}|$  qui ne dépendent à leur tour que des fonctions d'onde initiale  $\Psi_i$  et finale  $\Psi_j$  et donc de la répartition électronique entre ces deux états.

Le moment dipolaire de transition  $|R_{ij}|$  est le résultat théorique important. Il est exprimé en C.m. Par cette grandeur et au travers du développement mathématique exposé, l'absorption d'une onde lumineuse peut être rapidement "visualisée" comme un déplacement électronique. L'unité adaptée à ces déplacements est le Debye anciennement défini en e.s.u c'est-à-dire comme  $10^{-18}$  statcoulomb.cm. ce qui donne  $1\text{D} = 3.336 \cdot 10^{-30}$  C.m. 1 Debye correspond au déplacement d'un électron sur une distance de 40% du rayon de Bohr  $a_0$ .

Pour résumer, le nombre adimensionnel  $f$  se calcule:

- de manière théorique à partir des données cristallographiques (position des noyaux dans une molécule donnée) et la distribution des charges électroniques,
- et par les données expérimentales du spectre d'absorption.

### I.A.1.c. Généralités sur la fluorescence

La fluorescence est dite primaire lorsque les produits fluorescent naturellement. Le terme d'autofluorescence est aussi utilisé dans ce cas. Elle est dite secondaire lorsqu'elle s'effectue par l'intermédiaire de processus d'interaction avec des composés fluorescents appelés fluorochromes ou fluorophores.

#### I.A.1.c.i. Fluorescence primaire

Les composés organiques présentant une fluorescence primaire sont relativement peu nombreux mais sont très largement représentés dans la nature. Pour le règne végétal les lignines, l'acide férulique, qui constituent les parois, ainsi que des colorants présentent une fluorescence primaire [Gallant,1991]. Dans le règne animal, l'élastine et le collagène, les tissus conjonctifs donnent une fluorescence ainsi que les composés indoliques, les purines, les pyrimidines, les porphyrines... [Gallant,1991], [Wolfbeis,1988].

#### I.A.1.c.ii. Fluorescence secondaire

Parmi les deux cents composés fluorescents répertoriés au Code des index [Wolfbeis,1988] et utilisables en spectroscopie et en fixation sur des corps organiques, une dizaine sont à retenir en raison de leur forte absorption et émission. Ils appartiennent aux groupes des xanthènes (fluorescéine, rhodamine, éosine), des acridines et des phénazines.

#### I.A.1.c.iii. La fluorescence

La Figure I-1 du diagramme de Jablonski montre différents types de désactivation suite à une illumination:

☞ la fluorescence. Elle est caractérisée par une constante de vitesse  $k_F$  de l'ordre de  $10^9 \text{ s}^{-1}$ . On note aussi  $k^0 = 1/\tau^0$ ,  $\tau^0$  est appelé **durée de vie radiative** ou intrinsèque et représente la durée de vie de l'état excité considéré de la molécule dont le seul mode de désactivation serait la fluorescence.

Ce paramètre  $\tau^0$  peut être comparé à la valeur théorique appelée  $\tau_{\text{théo}}^0$  :

au niveau des généralités sur l'absorption nous avons vu que le coefficient d'Einstein  $A_{j \rightarrow i}$  est lié à l'absorption. Or par définition  $A_{j \rightarrow i} = 1/\tau^0$ . Nous avons le résultat final exprimé par la formule de Stickler et Berg [Berlman,1971] avec  $\tau_{\text{théo}}^0$  en s,  $\epsilon$  en  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  et  $\bar{\nu}$  en  $\text{cm}^{-1}$ :

$$\frac{1}{\tau_{\text{théo}}^0} = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \bar{\nu}^{-3} \rangle_{\text{moy}}^{-1} \int \frac{\epsilon}{\bar{\nu}} d\bar{\nu}.$$

avec  $\langle \bar{\nu}^{-3} \rangle_{\text{moy}} = (\int \bar{\nu}^3 F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}) / (\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu})$  et où  $n$  est l'indice de réfraction du milieu dans lequel la mesure est réalisée (pour l'eau à  $25^\circ\text{C}$ ,  $n=1.348$ ). En outre

soulignons pour le physicien que lorsque le spectre de fluorescence  $F(\bar{\nu})$  est représenté par le nombre de photons en fonction du nombre d'onde  $\bar{\nu}$ , son aire intégrée est proportionnelle à la probabilité de transition en  $s^{-1}$ .

☞ la conversion interne d'un état  $S_n$  à l'état  $S_1$  s'effectue sans émission de photons avec une constante de vitesse de l'ordre de  $10^{12}s^{-1}$ .

☞ la conversion interne d'un état  $S_1$  à l'état  $S_0$  est plus lente à cause de la plus grande différence d'énergie entre ces deux états. La constante de vitesse est notée  $k_{nr}^S$ .

☞ la conversion intersystème de l'état  $S_1$  vers l'état triplet  $T_1$  qui se produit avec une constante de vitesse  $k_{cis}$  que nous n'avons pas fait figurer sur le diagramme de Jablonski.

☞ et d'autres processus non radiatif dont on note la constante de vitesse par  $k_a$ .

Notons  $\tau_F = (k^0 + k_{nr}^S + k_{cis} + k_a)^{-1}$ ,  $\tau_F$  est le **temps de vie de fluorescence**, temps effectif encore appelé **temps de déclin qui correspond au temps de vie mesuré**.

Si  $[C^*]$  représente la concentration en molécules excitées dans l'état  $S_1$  on peut écrire

cette cinétique sous la forme: 
$$\frac{d[C^*]}{dt} = - \sum_{i=1}^n k_i [C^*] + I_{abs}.$$

où les  $k_i$  représentent les constantes de vitesse relatives aux différents modes de désactivation de l'état  $S_1$  et où  $I_{abs}$  représente le nombre de photons absorbés par seconde passant par l'état  $S_1$ .

Introduisons maintenant deux grandeurs  $F(t)$  et  $\Phi_F$ :

—  $F(t)$  est l'intensité de fluorescence observée au temps  $t$ ,

—  $\Phi_F$  le rendement quantique de fluorescence défini par le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis à partir de  $S_1$  et celui des photons absorbés (égal à  $[C^*]_0$ ):

$$\Phi_F = \frac{\int_0^{\infty} F(t) dt}{[C^*]_0}$$

Cette cinétique physique peut être traitée dans trois cas:

— avec une illumination continue; on parlera de fluorescence statique (régime stationnaire),

— avec une illumination infiniment brève

— avec une illumination expérimentale de largeur non négligeable

En fluorescence statique l'état stationnaire implique:

$$\frac{d[C^*]}{dt} = 0 \text{ et donc } I_{\text{abs}} = \sum_{i=1}^n k_i [C^*] \text{ et } [C^*] = [C^*]_0.$$

Avec une illumination infiniment brève on écrit:

$$\frac{d[C^*]}{dt} = - \sum_{i=1}^n k_i [C^*] = -(k_F + k_{nr}^S + k_{cis}) [C^*].$$

Ce qui donne:  $[C^*](t) = [C^*]_0 e^{-t/\tau_F}$ . Or par définition  $F(t) = k_F [C^*]$ .

Par le calcul de l'intégrale  $\int_0^\infty F(t) dt$  on obtient:

$$\Phi_F = \frac{\tau_F}{\tau_0}.$$

Cette relation reste valable quel que soit le type d'illumination.

Avec la loi de Beer-Lambert vue précédemment au niveau de l'absorption, on écrit:

$$[C^*]_0 = I_0 (1 - 10^{-\epsilon \ell [C]}).$$

Si la solution est assez diluée  $\epsilon \ell [C] < 0.05$  alors  $[C^*]_0 = 2.3 \epsilon \ell [C] I_0$ .

l'expression finale de  $F(t)$  exprimée en fonction des grandeurs mesurables  $\epsilon \ell [C]$

$$\Phi_F \text{ et } \tau_F \text{ est alors: } F(t) = [C^*]_0 = 2.3 \epsilon \ell [C] I_0 \frac{\Phi_F}{\tau_F} e^{-t/\tau_F}.$$

avec  $I_0$  l'intensité lumineuse initiale.

Et l'intégrale de  $F(t)$ ,  $H$  s'exprime par:

$$H([C]) = \int_0^\infty F(t) dt = (2.3 \epsilon \ell I_0 \Phi_F) [C].$$

Cette relation reste toujours valable dans les trois modes d'illumination.

**L'intégrale de la fluorescence en fonction du temps est donc une fonction linéaire de la concentration pour de faibles absorbances. Cette grandeur conditionne pour une large part la faisabilité d'un capteur chimique par fluorescence impulsionnelle résolue en temps.**

En outre nous voyons que cette intégrale est proportionnelle à l'intensité du flux d'excitation ( $I_0$ ) et du rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_F$ ). Les variations de l'intensité du faisceau excitateur entraînent donc un bruit proportionnel. La méthode de mesure est aussi sensible aux changements du rendement quantique qui peuvent intervenir lorsqu'une liaison entre un fluorophore et une autre molécule (enzymatique par exemple) est modifiée.

## I.A.2. Méthodes d'analyse de la fluorescence

Les corps que nous désirons en premier lieu mesurer ayant des propriétés optiques exploitables (indole, NADH), nous nous sommes orientés vers la réalisation d'un microcapteur extrinsèque à fibre optique. L'originalité de notre approche en instrumentation consiste:

- en premier lieu à adapter des techniques de fluorescence pour résoudre certaines contraintes techniques inhérentes aux capteurs chimiques à fibre optique (FOCS) en particulier la fluorescence des fibres optiques,
- et de réaliser un ensemble instrumental permettant une mesure quantitative sélective et rapide (<30s) *in vivo* chez l'animal non anesthésié et libre de tous mouvements sur au moins 24h en continu tout en préservant une simplicité de fabrication, de nettoyage et stérilisation de l'embout du capteur.

Étudions rapidement les diverses méthodes permettant l'exploitation des cinétiques physiques que sont l'absorption et la fluorescence.

### I.A.2.a. Analyse du signal en fluorescence

Avec les développements des photodétecteurs (chambre photographique plaque ou film, photodiode à avalanche, camera CCD, "streak camera", photomultiplicateur, galette de microcanaux), l'exploitation des phénomènes de fluorescence a donné naissance à deux grandes catégories de techniques:

- Imagerie de fluorescence utilisant des détecteurs bidimensionnels
- Fluorescence dite classique mettant en œuvre des détecteurs monodimensionnels.

#### I.A.2.a.i. Analyse d'image en fluorescence

En imagerie médicale, on distingue quatre types principaux d'imagerie:

- l'imagerie anatomique (tomodensitométrie, IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), angiographie numérisée,...),
- l'imagerie fonctionnelle (gammatomographie, magnéto-encéphalographie,...),
- l'imagerie positionnelle (dans le visible mais aussi dans l'IR et dans d'autres gammes du spectre électromagnétique),
- l'imagerie encyclopédique (atlas).

A l'heure actuelle la fluorescence n'est pas présente dans les trois premiers types d'imagerie médicale.

L'analyse d'image en fluorescence permet d'obtenir des informations essentiellement spectrales, les données quantitatives restant grossières. Cependant de nombreuses applications ont surgi en analyse agro-alimentaire, en chimie analytique [Gallant,1991] et en instrumentation biomédicale (mesure du NADH à la surface du cortex chez le rat [Ji,1977]). Récemment l'imagerie en FRPM ( aussi dénommée FLIM "Fluorescence

Lifetime Imaging") est apparue [Lakowicz,1992a] et [Lakowicz,1992b]. Cette nouvelle méthode FLIM peut être comparée à l'imagerie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) en apportant par contre des informations microscopiques et semi-quantitatives. De même en FRT domaine temporel, l'imagerie de fluorescence a récemment été appliquée en chimie analytique [Weng,1991]. Ces analyses d'images associées à des fibres optiques ouvrent de larges perspectives dans le domaine biomédical.

#### I.A.2.a.ii. Analyse du signal en fluorescence statique

La fluorescence statique permet d'obtenir un signal émis sur un spectre et résolue à une longueur d'onde (dite d'émission) et consécutif à une illumination constante d'une longueur d'onde (dite d'excitation). Ce signal est dépendant de ces deux longueurs d'onde. La représentation de l'intensité en fonction de ces deux degrés de liberté apporte des informations qualitatives à deux signatures. De plus nous avons vu que l'intensité lumineuse est proportionnelle à la concentration de fluorophore ouvrant la voie à des données quantitatives.

#### I.A.2.a.iii. Analyse du signal en fluorescence résolue en temps

Nous avons vu ci-dessus les aspects mathématiques des cinétiques photophysiques. Parcourons rapidement les méthodes expérimentales autorisant l'étude de ces cinétiques:

Classiquement l'analyse des systèmes est réalisée:

- par la réponse impulsionnelle c'est-à-dire de type impulsion théorique Dirac ou impulsion expérimentale. Dans le cas de la fluorescence on parle d'illumination infiniment brève ou d'illumination brève à largeur temporelle non négligeable (voir Figure I-2). La fluorescence résolue en temps est alors dans le domaine temporel,
- par la réponse harmonique consécutive à un signal sinusoïdal consistant en une modulation de l'intensité lumineuse (voir Figure I-3). La fluorescence résolue en temps est dite domaine fréquentiel.

#### I.A.2.a.iv. Domaine des fréquences: FRPM

Pour des temps de déclin de l'ordre de la nanoseconde les fréquences de modulation sont dans la gamme de 1 à 200 MHz. Ces temps de déclin peuvent être déterminés en fonction du déphasage  $\theta$  et de la modulation relative  $m$  (Figure I-3). L'absence de visualisation directe de la cinétique physique étudiée constitue le principal inconvénient de cette approche.

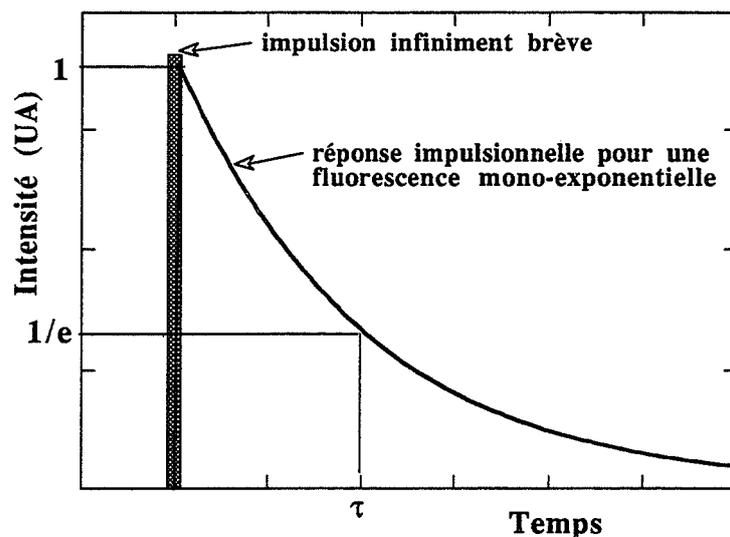


Figure 1-2:

Illumination et réponse en fluorescence résolue en temps domaine temporel

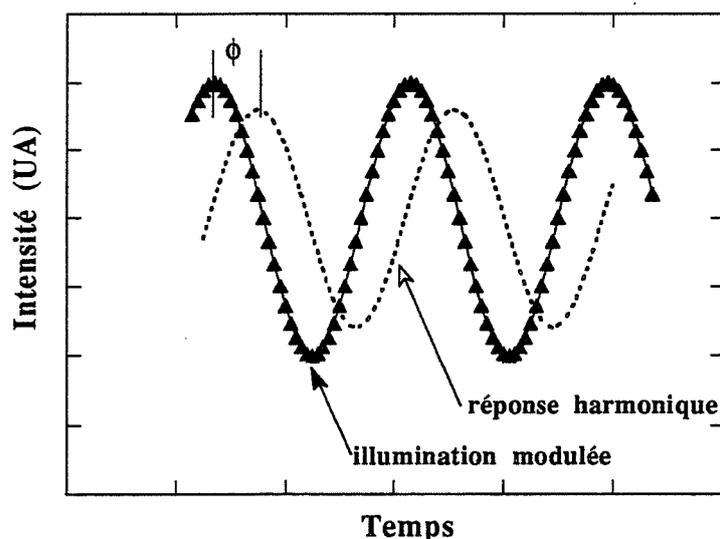


Figure 1-3:

Illumination et réponse en fluorescence résolue en temps domaine fréquentiel

#### I.A.2.a.v. Domaine temporel: FRT

La FRT dans le domaine temporel nécessite une illumination de préférence infiniment brève par rapport aux temps de déclin à résoudre. Cependant la forme temporelle de cette impulsion lumineuse ainsi que ses variations (reproductibilité tir à tir) pendant le laps de temps des expériences limitent cette méthode. De plus les temps de déclin de fluorescence des composés biologiques et des fluorophores à température ambiante sont très souvent inférieurs à 100ns ce qui nécessite un appareillage d'illumination et une électronique de

détection relativement coûteuses. Cependant certains efforts de recherche sur l'instrumentation en FRT [Desilets,1986] conjugués à la chute des prix des oscilloscopes numériques permettent de prévoir des instruments de FRT compacts et de coût raisonnable.

### I.A.2.b. Intérêt de la FRT en chimie analytique

Les principaux intérêts de la FRT domaine temporel par rapport à la fluorescence classique dans le domaine de la chimie analytique se résument à:

- la correction de l'inhibition dynamique de fluorescence [Hieftje,1981], et des effets de filtre interne [Matsui,1991],
- l'augmentation du rapport signal sur bruit par filtrage temporel [Russo,1982], [Seitzinger,1989],
- l'accès à une plus faible limite de détection [Kawabata,1985], ou par exemple son corollaire la diminution du temps d'incubation pour les méthodes d'identification bactérienne de profil par aminopeptidases (mesure du métabolisme des substrats L-amino acide  $\beta$ -naphtylamide non-fluorescents grâce au marqueur fluorescent  $\beta$ -naphtylamine) [Coburn,1985], [Hugues,1989], et pour les méthodes ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) d'identification virale [Azimi,1992],
- l'élimination d'interférents dans des solutions multicomposants [Bright,1986],
- la mesure de plusieurs composés non-fluorescents simultanément [Carroll,1989], et de plusieurs fluorophores qui par exemple se recouvrent spectralement [Chang,1993] (utilisés dans la méthode des quatre canaux associés aux quatre bases A-,T-,G- et C-dideoxynucleotides dans l'analyse des séquences de l'ADN),
- l'analyse de système hétérogène (surface, polymère, solide, biosystème) [Carraway,1991].
- la mesure de composés qui inhibent l'émission de fluorophore. La relation entre la concentration de ceux-ci et le temps de déclin de fluorescence permet une mesure quantitative absolue (c'est-à-dire indépendante des fluctuations de l'intensité excitatrice) [Gewehr,1993], [Green,1993].

#### I.A.2.b.i. Sensibilité

L'accès à des limites de détection les plus faibles possibles a été le premier but pour les applications de la FRT dans le domaine des capteurs chimiques. De même la possibilité de mesurer les temps de déclin de fluorescence de solutions ayant de très faibles émissions (de l'ordre de la bande Raman de l'eau) ont amené certaines équipes à développer un appareillage FRT adapté:

—soit avec mesure analogique et temps équivalent [Hart,1992],

—soit avec différents montages de TCSPC en configuration classique [Nowak,1991a], et en configuration inverse et interactive. Cette dernière configuration permet un gain d'un facteur six au niveau de la sensibilité de détection (en nombre de coups par molécule en solution (coups/M)) et d'un facteur deux pour la limite de détection [Nowak,1991b].

L'analyse fluorimétrique des molécules en solutions présente l'avantage d'une bonne sensibilité. Cependant il est bien connu que la fluorescence parasite, les diffusions Raman et Rayleigh du solvant limitent cette méthode. De plus il a été reconnu que la fluorescence excitée par laser (excitation soit plus puissante que les systèmes à lampe) ne conduit pas à améliorer la sensibilité jusqu'à environ 5 ordres de grandeur comme prédit à cause de l'augmentation du bruit généré par les émissions parasites [Basile,1993]. Le filtrage temporel est très efficace pour éliminer un bruit photonique situé dans le même domaine spectral que les composés recherchés pouvant aller jusqu'à un facteur cinq pour des matrices biologiques complexes [Coburn,1985]. Les diffusions lumineuses étant synchrones de la source, le filtrage est mis en œuvre par l'utilisation de sources et d'électronique ayant des largeurs temporelles bien inférieures au temps de déclin de fluorescence des composés mesurés et par le choix d'une fenêtre temporelle adaptée [Russo,1982], [Seitzinger,1989], [Basile,1993].

La FRT permet aussi d'avoir accès au facteur pré-exponentiel (voir la partie ci-dessus "généralité sur la fluorescence") qui est relié à la concentration du corps émissif tout en étant indépendant des interactions de ce corps avec d'autres éléments (inhibiteurs...). Pour les méthodes utilisant la fluorescence statique, ces interactions engendrent une baisse du niveau de l'intensité lumineuse par des transitions non-radiatives entraînant soit un bruit important soit des irréproductibilités. Des limites de détection de PAH (Polynuclear Aromatic Hydrocarbons) de 60pM ont été atteintes en prenant comme signal le facteur pré-exponentiel plutôt que l'intensité de fluorescence intégrée [Kawabata,1985]. De plus les courbes de calibration obtenues sont indépendantes de la concentration en oxygène.

La fluorescence induite par excitation laser, l'optimisation de la chambre de mesure et les techniques de comptage de photo-électrons uniques (TCSPC) ont permis d'atteindre la détection d'une seule molécule (rhodamine, B-phycoerythrin) en solution [HoonHahn,1991]. Dernièrement la détection de molécule unique (fluorophore IR-132), toujours en solution, a été réalisée en associant le domaine de ces deux longueurs d'onde dans le proche IR ( $\lambda_{exc}=805\text{nm}$  et  $\lambda_{em}=847\text{nm}$ ) et plusieurs développements en instrumentation (choix d'un nouveau photodétecteur: diode à avalanche, choix d'un laser Saphir dopé titane "mode-locked" et d'une électronique TCSPC et d'un filtrage temporel

de la lumière de fluorescence d'impuretés et des diffusions dues au solvant...) [*Soper,1993*]. Ainsi le niveau d'efficacité de détection de cette molécule atteint 97%.

#### I.A.2.b.ii. Sélectivité

La sélectivité chimique et aussi la possibilité de mesurer simultanément plusieurs composés a été le deuxième moteur pour appliquer la FRT en chimie analytique.

La sélectivité peut être

- directe: mesure de propriétés photochimiques des molécules étudiées (fluorescence primaire),
- ou indirecte: mesure par reconnaissance biologique, par réactivité physico-chimique ou par interaction physique avec un fluorophore (fluorescence secondaire).

L'utilisation de la réactivité d'un agent complexant et de la mesure des propriétés photochimiques des complexes formés permet d'analyser quantitativement et simultanément des mélanges de plusieurs composés. Mais le plus souvent les propriétés spectrales des différents complexes sont très proches limitant la sensibilité et la sélectivité. Avec la FRT, l'ajout de la mesure d'une autre signature (temps de déclin de ces complexes) permet d'atteindre la détermination des concentrations respectives [*Carroll,1989*].

#### I.A.2.b.iii. Rapidité de mesure

Traditionnellement les données de déclin de fluorescence pouvaient être obtenues sur une période supérieure à plusieurs minutes à cause des niveaux de comptage. Cet état de fait a masqué l'utilité de cette technique et empêché son application à des domaines comme la chromatographie, la cytométrie de flux, la mesure de turbulence ainsi que celui des capteurs en chimie analytique. Devant cette constatation Lytle et coll. ([*Seitzinger,1989*], [*Nowak,1991a*], [*Nowak,1991b*], [*Campos,1992*], [*Basile,1993*]) et d'autres équipes [*Hart,1992*] ont cherché à développer des appareillages en FRT pour atteindre une mesure quantitative et rapide axée essentiellement sur la chimie analytique. Ces appareillages mettent en œuvre

- la TCSPC classique [*Seitzinger,1989*] (temps de collection (TC) inférieures 60s),
- la TCSPC en configuration inversée et interactive [*Nowak,1991a*] (TC commençant à 1s), [*Nowak,1991b*] (TC débutant à 10ms),
- et les digitalisations en temps équivalent [*Nowak,1991b*] (TC à 8 $\mu$ s), [*Hart,1992*] (TC supérieure à plusieurs centaines de secondes).

En fait pour comparer strictement les techniques de comptage avec celle de mesure analogique, il faut analyser le signal en terme de photo-électron unique ou de photo-électron unique équivalent dénommé SPE (Single PhotonElectron). En TCSPC classique

le nombre de SPE collecté pour déterminer un temps de déclin sur au moins trois décades s'élève au minimum à  $10^6$  SPE.

Pour la TCSPC en configuration inversée et interactive avec un laser à 4MHz et sur une fenêtre temporelle de 50ns avec une résolution subnanoseconde, le taux de comptage maximum admissible de SPE est de l'ordre de 80kHz dans l'état actuel des techniques. Pour des configurations plus classiques un taux de comptage de SPE est au niveau de 10kHz. Le taux de collection est alors respectivement de  $80 \cdot 10^3$  SPE/s ou de  $10 \cdot 10^3$  SPE/s [Nowak,1991a].

Pour des systèmes temps-réel utilisant un laser à basse cadence (20Hz) et mesurant un signal équivalent à 50 SPE par impulsion laser sur une fenêtre temporelle de 50ns avec une résolution subnanoseconde, le taux de collection est de  $10^3$  SPE/s [Hart,1992].

Pour une instrumentation en temps équivalent utilisant un laser à 4MHz et 10 SPE par impulsion, le taux de collection se situe vers  $40 \cdot 10^6$  SPE/s [Nowak,1991b].

Il reste à définir à partir de combien de SPE, le signal est exploitable et sort du bruit, cela doit se faire en fonction de la nature du bruit et des données recherchées (temps de déclin, modèle mono- ou multi-exponentiel, concentration...) [Nowak,1991b]. En fonction du nombre de SPE, le temps de collection dépend de l'unité laser-acquisition. Il faut néanmoins souligner l'obtention d'un meilleur rapport signal/bruit pour les méthodes utilisant un discriminateur.

Finalement deux options se dégagent de cette analyse pour l'appareillage associé au FOCS:

- mesure à "haute cadence" (plusieurs dizaines ou centaines de kHz) qui présente un meilleur rapport signal/bruit, mais aussi un coût assez élevé et nécessitant une maintenance spécialisée,
- mesure à "basse cadence" (quelques dizaines de Hz) plus simple à mettre en œuvre (transportable, plus compacte...).

### I.A.3. Utilisation de ces méthodes

#### I.A.3.a. Une récente technologie: les capteurs à fibre optique.

##### I.A.3.a.i. Introduction sur les FOCS

Pendant les années soixante-dix, les progrès technologiques concernant les fibres optiques ont été prodigieux [Brendle,1983]. Les technologies de production de masse de ces guides de lumière ont permis de parvenir à des atténuations très faibles sur plusieurs Km avec des coûts de fabrication diminués [Levy,1985]. En 1970 l'atténuation des fibres optiques est passée de valeurs élevées (100 à 1000dB/Km) à 20dB/Km. Par la suite on devait obtenir des atténuations de 4dB/Km en 1972, puis de 2dB/Km en 1973 et à la fin des années soixante-dix, la valeur limite d'atténuation de 0.2dB/Km à 1.6 $\mu$ m pour des fibres en silice a été atteinte [Miya,1980]. Consécutivement à ces avancées et aux progrès des lasers et des récepteurs opto-électroniques, de nombreuses applications de ce nouveau "conducteur" ont débouché créant de vastes marchés regroupés sous la dénomination de photonique (réseaux et communication à hauts débits, applications médicales de l'endoscopie et des lasers médicaux [Boulnois,1988]...). La photonique est née de l'optique comme l'électronique de l'électricité. C'est une technologie horizontale, c'est-à-dire qu'elle concerne aussi bien la recherche, le développement et la production. Très rapidement le secteur de l'instrumentation a été touché par la photonique [Goure,1990]. Dès 1983, un congrès annuel spécifique "Optical Fibers Sensors" (OFS à Londres en 1983, Stuttgart en 1984, San Diego en 1985...) fait le point des avancées techniques. Les capteurs de mesure physique à fibre optique constituent la majorité des développements industriels et de la recherche scientifique concernant la métrologie. Les parents pauvres que sont les capteurs chimiques à fibre optique (FOCS) commencent à apparaître à la fin des années soixante-dix sous la forme d'ajout de fibre optique à des appareils de mesure optique classique (spectrofluorimétrie, spectrophotométrie) [Mitchell,1976] et [Smith,1977].

Différentes catégories de FOCS avec leur instrumentation associée sont apparues:

- capteur extrinsèque où la fibre ne constitue qu'un élément passif chargé de véhiculer la lumière, l'instrumentation associée restant souvent inchangée par rapport aux instruments à optique non guidée [Borman,1981], [Krull,1988],
- capteur semi-intrinsèque où la grandeur optique mesurée découle d'une réaction chimique localisée à la surface des fibres,
- capteur intrinsèque où les phénomènes de guide de lumière interviennent directement dans la mesure chimique (variations d'indice de réfraction, d'ondes évanescentes corrélées avec les variations de concentrations chimiques...) [Archenault,1992], [Ronot,1993].

Trois articles de synthèse concernant la première décennie de recherche donnent une vue de l'ampleur de l'engouement de ces recherches: le premier en fonction des produits mesurés [Seitz,1988], le second en fonction des secteurs d'application [Narayanaswamy,1988] et le troisième en deux parties capteurs pour la chimie analytique et pour le domaine clinique [Wolfbeis,1988]. Depuis le début des années quatre-vingt-dix, deux travaux originaux émergent franchement:

- un FOCS par fluorescence de mesure d'O<sub>2</sub> gazeux où l'ensemble du revêtement constitue le capteur semi-intrinsèque qui est donc une sonde distribuée spatialement [Lieberman,1990],
- un FOCS submicronique de pH [Tan,1992].

#### I.A.3.a.ii. Avantages des FO en chimie analytique

Suivant les domaines d'applications, la mesure par FO offre certains avantages par rapport aux méthodes classiques utilisées en chimie analytique:

- 1...Les capteurs optiques ne nécessitent pas un signal de référence comme cela est souvent nécessaire pour les méthodes électrochimiques.
- 2...La miniaturisation des FO permet le développement de capteurs très petits et souples. Cette particularité est d'une grande utilité dans les cas où les volumes d'échantillons sont petits ou pour l'utilisation dans des cathéters en médecine. A l'heure actuelle l'embout sensible du capteur à fibre est susceptible d'être plus petit que n'importe quel capteur électrochimique (en y incluant les transistors à effet de champ).
- 3...Les faibles pertes des FO permettent de réaliser des mesures distantes allant de quelques mètres à plusieurs kilomètres. La mesure déportée permet d'effectuer des analyses dans des chambres blanches, ou sur des échantillons dangereux ou à très faible température [Dinkel,1992] ou encore dans des environnements radioactifs, les fibres étant assez résistantes aux radiations de l'ordre de 10<sup>7</sup> rad [documentation Quartz et Silice].
- 4...Du fait que le signal soit uniquement optique, il n'est pas sujet aux interférences électromagnétiques et aux traditionnels problèmes électriques comme l'électricité statique. Les fibres ne présentent aucun risque électrique (étincelles). Au niveau sécurité, les FOCS sont donc de meilleurs candidats pour des mesures à buts médicaux y compris en médecine ambulatoire.
- 5...Les mesures peuvent être très rapides. Ainsi des temps de réponse aussi courts qu'une milliseconde ont été rapportés pour des capteurs à oxygène fondés sur la méthode d'inhibition de fluorescence [Wolfbeis,1988].
- 6...Plusieurs FOCS placés dans différents sites peuvent être couplés à un seul appareil d'illumination et de détection via des "choppers". Ces méthodes permettent une multiplicité de sites d'analyse avec un seul instrument central.

D'autres techniques comme les FOCS distribués spatialement sont développés [*Lieberman,1990*].

- 7...Pour la majorité des FOCS, l'embout du capteur ne consomme pas le corps à analyser comme c'est le cas pour les électrodes ampérométriques. Ainsi les FOCS mettent souvent en œuvre des méthodes analytiques non destructives.
- 8...Les FOCS peuvent mesurer des composés chimiques ou des paramètres physicochimiques inaccessibles par voie électrochimique.
- 9...Les FO transmettent beaucoup plus d'informations que les conducteurs électriques du fait que la lumière contient intrinsèquement plus d'informations que les électrons (la longueur d'onde, la phase ou le temps de déclin, la polarisation et l'intensité). Une seule FO peut guider un signal à plusieurs longueurs d'onde différentes et permettre, en principe, l'analyse de plusieurs signaux simultanément. La résolution temporelle couplée à la résolution spectrale offre donc de larges potentialités.
- 10...Les FOCS peuvent se révéler moins coûteux que les électrodes en considérant les développements industriels considérables de l'opto-électronique.

#### I.A.3.a.iii. Inconvénients des FO en chimie analytique

En dépit de nombreux avantages par rapport aux autres capteurs, les FOCS présentent les inconvénients suivants:

- 1...La lumière ambiante peut interférer dans certains cas ; cependant l'utilisation de signaux impulsionnels, modulés ou harmoniques permet de s'affranchir de ce parasite.
- 2...De plus les FO présentent des impuretés fluorescentes (variables suivant la qualité et le fabricant) et un bruit photonique par diffusions Raman, Rayleigh... A cause de leur absorption et aussi de leur fluorescence, les FO de très bas prix (fibres en plastique) ne sont utilisables généralement qu'à des longueurs d'onde supérieures à 400nm. La lumière UV nécessite l'utilisation de FO en quartz. Malgré les qualités de ce matériau, un bruit photonique persiste. Généralement pour ces raisons et pour une excitation UV ( $\lambda_{exc} \leq 400\text{nm}$ ), les détections limites apparentes des FOCS sont dix fois plus mauvaises que celles mesurées en cuvette [*Thompson,1993*].
- 3...Certains FOCS peuvent présenter une zone de mesure plus faible par rapport aux électrodes (ce qui est le cas pour les FOCS où des indicateurs de pH sont immobilisés) [*Lakowicz,1993b*].
- 4...Les capteurs utilisant la fluorescence secondaire peuvent être limités par la stabilité à moyen terme en raison de la photodégradation et des problèmes classiques d'immobilisation (relarguage, stabilité du polymère...). En

---

conséquence, l'excitation laser doit être utilisée seulement si cela s'avère nécessaire afin de minimiser la photodégradation.

- 5...Les accessoires commerciaux des systèmes optiques pour FO ne sont pas encore totalement satisfaisants sur certains plans techniques comme le domaine spectral, une autofluorescence importante, et sont parfois d'un coût élevé (connecteurs, sources lumineuses, photodétecteurs...).
- 6...De nombreux indicateurs sélectifs (fluorophores) sont à développer ainsi que les techniques d'immobilisation afin d'atteindre les meilleures sensibilités et sélectivités.
- 7...Par rapport aux méthodes optiques traditionnelles l'utilisation des FO entraîne souvent une réduction de la sensibilité due en particulier aux interfaces optiques classiques et optique guidée (injection du flux lumineux dans une FO et récupération du flux en sortie de FO).

#### I.A.3.a.iv. Applications

Sans nous étendre sur une bibliographie exhaustive ([Murray,1989], [Arnold,1992], [Janata,1992], [Warner,1992]), nous indiquons dans le tableau ci après un certain nombre d'équipes qui se sont investies dans ce domaine et que l'on retrouve souvent dans les travaux publiés ainsi que sommairement et de manière non exhaustive leur domaine et leurs orientations.

nom	adresse	domaine	orientations
Arnold, M.A.	Dep. of Chem. Eng. Univ. Iowa IO-52242, Iowa city, USA.	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque en solution et ex-vivo [Kar, 1992]
Bright, F.V.	Dep. of Chemistry Univ. of New York NY-14214, Buffalo, USA	Instrumentation de la FRT	FRT et capteur semi-intrinsèque
Chance, B.	Johnson Research Foundation Univ. Pennsylvania PA-19174 Philadelphia, USA	Génie biomédical	capteur extrinsèque <i>in vivo</i> [Weiss, 1978]
Cox, M.E Parker, J.	UCLA Crump Inst. for Med. Eng. CA-90024 Los Angeles, USA	Chimie analytique des solutions et polymères	capteur semi-intrinsèque
Dakin, J.P.	Plessey Elect. Syst. Res. Lim. E-P09 2PE, Havant, Hants, U.K.	Chimie analytique	capteur semi-intrinsèque
Hieftje, G.M.	Dep. of Chemistry Univ. Indiana IN-47405 Bloomington, USA	Instrumentation de la FRT	FRT et capteur semi-intrinsèque
Giuliani, J.F.	Chem. Div. US Naval Research Laboratory Washington DC-20375-5000, USA	Chimie analytique des gaz	capteur intrinsèque gaz
Krull, U.J.	Dep. of Chem. Univ. Toronto L5L1C6, Mississauga, Canada	Chimie analytique	capteur extrinsèque et semi-intrinsèque
Lieberman, S.H.	Marine Environ. Branch Code 522 Naval Ocean Systems Center CA-92152-5000 San Diego, USA	Environnement	capteur extrinsèque en milieu marin, FRT [Inman, 1990]
Lippitsch, M.E.	Institute of Experimental Physics Karl-Franzens University A-8010 Graz, Austria	Instrumentation	FRT et capteur semi-intrinsèque
Lübbers, D.W.	Max Planck Ins. für Systemphysio. Rheinlanddamm 201 D-4600 Dortmund, Germany	Génie biomédical	capteur semi-intrinsèque à fluorescence <i>in vivo</i> [Gehrich, 1986]
Mayevsky, A.	Dep. of Life Sci. Univ. Bar-Ilan IS-52100 Ramat-Gan, Israël	Génie biomédical	capteur extrinsèque biomédicaux de mesure de NADH dans le cerveau [Mayevsky, 1982]
Milanovitch, F.P.	Lawrence Livermore Nat. Lab. Univ. California CA-94550 Livermore, USA	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque
Narayanaswamy, R.	Dep. of Instrum. and Anal. Sci. Univ. of Manchester PO BOX 88, M60 1QD, U.K.	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque à fluorescence en solution, immobilisation sur fibre
Papkovsky, D.B.	Dep. of Biosensors Research Centre for Mol. Diagn. 113149 Moscow, USSR	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque à fluorescence en solution, FRT
Peterson, J.I.	Biomed. Eng. Instrum. Branch Building 13, NIH MA-20205, Bethesda, USA	Génie biomédical	capteur semi-intrinsèque à fluorescence <i>in vivo</i> [Peterson, 1980], [Peterson, 1984]

Schultz, J.S.	Dep. of Chem. Eng. Univ. Michigan MI-48109, Ann Arbor, USA.	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque en solution
Seitz, W.R.	Dep. of Chemistry Univ. of New Hampshire N.H.-03824 Durham, USA.	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque à fluorescence en solution
Sepaniak, M.J. Tromberg, B.J.	Dep. of Chem. Univ. Tennessee TE-37996-1600, Knoxville, USA	Génie biomédical	capteur extrinsèque et semi-intrinsèque à fluorescence <i>in vivo</i> [Sepaniak, 1983], [Tromberg, 1984]
Simon, W.	Dep. of Org. Chem. Swiss Federal Inst. of Techn. CH-8092, Zürich, Suisse.	Génie biomédical	capteur semi-intrinsèque en solution et ex-vivo
Suzuki, K.	Dep. of Appl. Chem.; Univ. Keio, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku J-223 Yokohama, Japan	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque en solution
Svanberg, S.	Dep. of Phys.; Inst. of Tech. PO BOX 118 S-221 00, Lund, Suède	Génie biomédical	capteur extrinsèque médicaux avec FRT; localisation tumeur <i>in vivo</i> [Andersson, 1989], [Andersson, 1987]
Thomson, R.B.	Dep. of Bio. Chem., Univ. Maryland School of Med. MA-21201 Baltimore, USA	Chimie analytique; Environnement	capteur semi-intrinsèque en solution et FRPM
Vo-Dinh, T.	advanced Monitoring Dev. group. Lab. Oak Ridge TN-37831, Oak Ridge, USA	Chimie analytique	capteur semi-intrinsèque à fluorescence
Walt, D.R.	Max Tishler Lab. Univ. Tufts MA-02155, Medford, USA	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque
Wolfbeis, O.S.	Institute of Organic Chemistry Karl-Franzens University A-8010 Graz, Austria	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque à fluorescence; immobilisation sur fibre; FMF
Zhujun, Z.	Dep. of Chem. Univ. Shaanxi Xian, Shaanxi, Chine	Chimie analytique en solution	capteur semi-intrinsèque en solution

nom	adresse	domaine	orientations
Bertin Sté (Ollion, M., Hache, J.)	BERTIN Z.I. des Gâtines; BP 3 F-78373 Plaisir , France	Instrumentation	capteur extrinsèque et semi- intrinsèque
Boisde, G. Perez, J.J.	DCC; CEA; BP 6 F-92265 Fontenay-aux roses, France	Instrumentation	FRT; capteur extrinsèque et semi-intrinsèque
Coulet, P.R.	Lab. de Génie enzymatique Univ. Cl. Bernard F-69622 Villeurbanne, France	Génie biologique	capteur semi-intrinsèque à chimiluminescence en solution
Dao, N.Q.	lab. de Chim. PhysicoChim. UA 441 CNRS, Ec.Centrale Paris F-92295 Chatenay Malabry,France	Chimie analytique en solution	capteur extrinsèque par effet Raman
Fages, F. Lamotte,M.	LPPM, URA CNRS 348 Univ. Bordeaux 1 F-33405 Talence, France	Environement	capteur semi-intrinsèque à fluorescence in situ (en mer)
Goure, J.P.	Lab. TSI Univ. de St-Etienne F-42023 St-Etienne, France	Chimie analytique gaz et Génie médical	capteur intrinsèque gaz; immobilisation sur fibre; FRT <i>in vivo</i> [Mottin,1993]
Renault, G. Pocidalò, J.J.	INSERM U13 Hôpital Cl. Bernard F-75944 Paris cédex 19, France	Génie médical	capteur extrinsèque médicaux; mesure du NADH <i>in vivo</i> [Renault,1987a]
Shell Recherche (Hubert, C.)	Shell Recherche S.A. F-76530 Grand Couronne, France	Instrumentation	capteur extrinsèque et semi- intrinsèque à absorption
Viret, J. Testylier, G. Clarençon, D.	CRSSA Av. du Maquis de Grésivaudan F-38 Grenoble, France	Génie médical	capteur extrinsèque <i>in vivo</i> [Testylier,1987], [Chappey,1990]

Les développements des FOCS "in-line" dans le secteur industriel du génie chimique (suivi et optimisation des procédés) [Callis,1987] et en biotechnologie [Brown,1985] (pour le contrôle de fermentation [Junker,1988] ) restent au second plan. Concernant ce vaste marché, quelques travaux français du CEA ([Boisde,1984], [Boisde,1988a], [Boisde,1988b], [Boisde,1988c], [Boisde,1989] ) et de la Société Bertin sont à remarquer ainsi que ceux des sociétés américaines Guided Waves et LT instrument qui proposent des FOCS extrinsèques vers l'IR jusqu'à 2  $\mu\text{m}$ .

Par contre l'activité biomédicale s'affirme au premier plan avec une nette préférence pour les capteurs semi-intrinsèques à fluorescence statique [Peterson,1984], [Schultz,1985], [Miller,1987]. De nombreux problèmes surgissent cependant lors du passage du laboratoire au stade de l'animal vivant ou de la mesure chez l'homme: biocompatibilité, aspects mécaniques et stabilité requise au minimum de 72 à 96 h pour des implants artériels [Collison,1990]. Les développements industriels du secteur biomédical restent timides [Davis,1986], [Silberman,1988]. Sans être exhaustif, nous présentons quatre applications médicales pour des usages en milieu hospitalier actuellement disponibles. Elles sont commercialisées par les sociétés suivantes:

- Oximetrix de Montain View (Californie,USA)
- Cardiovascular Devices Inc. de Irvine (Californie,USA) [Miller,1987]
- Lightsense Corporation de Santa Monica (Californie,USA)
- International Biomedics Inc. de Bethesda (Washington,USA) [Moretti,1987].

Oximetrix propose des systèmes d'oxymétrie veineuse avec un capteur extrinsèque à fibre optique. Avec trois LED (light emitting diode) émettant à différentes longueurs d'onde (600,700 et 800nm) mixées dans un seule fibre montée dans un cathéter. L'interaction lumière-sang (absorption et réflexion) donne un signal guidé par une autre fibre optique et analysé en temps réel. Cardiovascular Devices Inc. Lightsense Corporation et International Biomedics Inc. proposent des appareils de suivi en continu intra vasculaire des gaz et du pH du sang ( $P_{O_2}$ ,  $P_{CO_2}$  et pH). Ces instruments mettent en oeuvre des capteurs semi-intrinsèques à fluorescence ou à absorption (pour International Biomedics Inc.) spécifiques pour ces trois paramètres.

Les espoirs les plus attendus concernant ces FOCS sont leur aptitude à la miniaturisation, à la stérilisation (ou même à être jetable), leur biocompatibilité (meilleure que les capteurs électrochimiques) et la possibilité d'être une aide au diagnostic en temps réel. Ces capteurs s'insèrent dans un vaste domaine: celui des biocapteurs [Regnault,1987], [Schultz,1991], [TranMinh,1991].

Au niveau biomédical, les développements de FOCS peuvent actuellement être classés en deux catégories:

- l'une orientée vers l'aide à la chirurgie (encore appelée thérapie photodynamique pour la localisation de tumeurs et thérapie par photosensibilisation [Boulnois,1988], [Hirano,1989], [Andersson,1989], [Andersson,1990] ) ou de surveillance de vie cellulaire (mesure de NADH d'organe ou de tissu) [Mayevsky,1982], [Renault,1987a].
- la seconde axée sur l'aide au diagnostic au sens large et à la mesure en temps réel des variations de concentration de composés présents dans des fluides ou dans des tissus vivants [Peterson,1980], [Sepaniak,1983], [Peterson,1984], [Gehrich,1986], [Chappey,1990].

#### I.A.3.b. Utilisation de la FRT pour la réalisation de FOCS

Nous avons vu que les FOCS par fluorescence constituent la catégorie la plus importante des développements. Actuellement l'utilisation de la fluorescence résolue dans le temps pour la conception de FOCS reste encore très marginale.

Au niveau de l'intérêt de la FRT en chimie analytique, nous avons vu que la FRT peut mettre en oeuvre les phénomènes suivants:

- phénomènes photophysiques de fluorescence de base,
- phénomènes d'inhibition dynamique de fluorescence,
- phénomènes de transfert d'énergie.

En FRPM combinée avec un capteur à fibre optique, quelques travaux sont à indiquer.

Ils concernent:

- la réalisation d'un capteur semi-intrinsèque bifibre à oxygène avec des LED modulées par inhibition dynamique de la fluorescence [*Lippitsh,1988*],
- des développements de membranes permettant la détection de pH, de pCO<sub>2</sub> et du glucose sur la base de principes de transfert d'énergie [*Lakowicz,1993a*], [*Lakowicz,1993b*]. Ces membranes ont été utilisées pour réaliser un FOCS monobrin semi-intrinsèque de mesure de pH par excitation laser [*Thompson,1993*]. Grâce à la mesure des temps de fluorescence, des précisions de 0.02 unité pH ont été obtenues avec une dynamique de mesure plus importante que celle des FOCS utilisant seulement l'intensité de fluorescence (gamme de pH 4.5 à 8).

En FRT dans le domaine temporel quelques développements de FOCS sont à signaler:

- la réalisation d'un capteur extrinsèque monobrin avec fluorescence induite par laser résolue dans le temps (gamme de la milliseconde) permettant la mesure d'euporium Eu<sup>3+</sup> en solution thermostatée ou à très basse température [*DexpertGhys,1988*],
- un FOCS semi-intrinsèque monobrin pour la mesure d'anticorps par des agents chélatants (Eu<sup>3+</sup>) ayant des temps de fluorescence supérieurs à plusieurs microsecondes [*Petrea,1988*],
- un FOCS extrinsèque bi-brins avec microcellule à circulation et membrane en nafion mesurant la fluorescence d'uranyl (UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>) [*Varineau,1991*],
- les travaux de l'équipe de Hieftje [*Vickers,1987*], [*Carroll,1989*] concernant la réalisation de FOCS semi-intrinsèques bi-brins.

A notre connaissance personne, avant ce travail, n'avait utilisé la fluorescence résolue dans le temps (gamme nanoseconde) pour caractériser fluorescence résiduelle intrinsèque des fibres optiques et réaliser un filtrage temporel séparant cette fluorescence résiduelle du signal recherché en vue de réaliser un FOCS monobrin. On peut signaler l'utilisation de grande longueur de FO (plus de 25m) pour être en même temps une ligne à retard et le guide du signal afin de séparer le bruit électromagnétique généré par l'impulsion laser et le moment où la détection est réalisée [*Tsunoda,1990*].

## I.B. Matériel

### I.B.1. Choix des techniques et des méthodes de la FRT domaine temporel

Après avoir décrit les différentes méthodes de FRT, abordons maintenant les progrès instrumentaux liés à ces méthodes. Deux catégories de techniques instrumentales mettent en œuvre la FRT domaine temporel dans le domaine subnanoseconde:

☞ à partir d'un photomultiplicateur:

—Détection analogique (Oscilloscope à échantillonnage, digitaliseur, intégrateur "box-car" ),

—Comptage de photo-électron et conversion temps-amplitude (TCSPC),

☞ à partir d'un capteur CCD: "Streak camera".

#### I.B.1.a. Détection analogique sans discriminateur

Le discriminateur permet le choix de paramètres techniques pour différencier une impulsion provenant d'un photo-électron de celui d'un électron issu d'une autre origine (parasite, thermique...). Trois techniques sont utilisées:

—le "box-car" qui mesure le signal sur une porte de largeur temporelle fixe. Pour chaque impulsion l'intensité sur une seule porte est l'information captée ce qui nécessite un moyennage sur chaque porte (si la distribution temporelle de l'impulsion est nécessaire il faut en plus refaire l'opération sur plusieurs portes) [*Pease,1988*].

—oscilloscope à échantillonnage en temps équivalent qui comme le "box-car" digitalise un point par impulsion et nécessite des signaux répétitifs [*Bulmar,1992*]. Ce mode d'acquisition permet d'atteindre des résolutions temporelles jusque dans la gamme sub-picoseconde.

—digitaliseur de transitoire en temps réel. Contrairement au mode d'échantillonnage en temps équivalent, la digitalisation d'une seule impulsion est réalisée sur des intervalles temporels réguliers en temps réel. Chaque impulsion est discrétisée sur plusieurs points. Ce mode d'acquisition est mis en œuvre par deux technologies la conversion —Analogique/Digital flash et —par intermédiaire d'une matrice de photodiodes (technique développée sur les machines 7912 et SCD de la Société Tektronix).

A l'heure actuelle, les intervalles de temps de discrétisation sont au maximum de 1ns pour la conversion flash. Mais avec un entrelacement par 4 ou 8 de ces convertisseurs flash, des intervalles de 250ps semblent prochainement accessibles. L'autre mode de conversion atteint au minimum 2ps de résolution (SCD 5000). L'appareil utilisé pour notre fluorimètre est un Tektronix 7912 permettant des intervalles de 10ps.

Toutefois la cadence d'échantillonnage en temps réel n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. Il faut de plus considérer la bande passante de l'ensemble de l'électronique de l'oscilloscope. Pour le Tektronix SCD 5000, la bande passante est de 4.5GHz soit un temps de montée de l'ordre de 78ps ce qui est 15 fois supérieur à la résolution temporelle.

Ces technologies d'échantillonnage en temps réel impose une autre limite: le taux de répétition des impulsions, dans l'état actuel des techniques, doit être inférieur à 20Hz. Par contre en temps équivalent, le taux de répétition peut aller jusqu'à plusieurs centaines de MHz. On voit ici que le choix du laser ou de la source d'excitation est intimement lié au choix de l'électronique.

#### I.B.1.b. Détection avec discriminateur

La méthode de corrélation temps-amplitude, associée au comptage, dénommée alors TCSPC, présente un avantage technique par rapport aux autres méthodes: la mesure n'est plus une intensité mais un l'intervalle de temps séparant deux déclenchements. Ce délai est associé à un photo-électron et mesure la différence entre le moment de l'excitation et le moment de la mesure réalisée par un "TAC" (Time to Amplitude Converter) [OConnor,1984]. La méthode TCSPC nécessite une source d'excitation de fréquence supérieure à plusieurs kHz afin d'obtenir des temps de comptage raisonnables et suffisant pour avoir l'enveloppe temporelle de la fluorescence et mesurer les temps de déclin sur au moins trois décades. Nous ne nous étendrons pas, ici, sur les avantages et inconvénients de ces méthodes par rapport aux méthodes décrites ci-dessus.

#### I.B.1.c. "Streak camera"

En face des PM limités en temps de montée par leur technique de multiplication des électrons, la "streak camera" peut opérer jusqu'à des résolutions temporelles de 0.6fs avec des cadences supérieures aux MHz [Wirth,1990]. La streak camera a en commun avec le PM, la photocathode. Lorsque la lumière atteint celle-ci, les photo-électrons générés sont accélérés et défléchis extrêmement rapidement. Lorsque ces photo-électrons accélérés touchent la galette de micro-canaux, ils sont multipliés par un facteur de l'ordre de  $10^4$ . Après ce gain, ils arrivent sur l'écran phosphore et génèrent une image spatiale corrélée en temps par la vitesse de déflexion. Cette image est "lue" par une caméra CDD bi-dimensionnelle (typiquement 640 (axe longueur d'onde)\*480 (axe temporel) pixels codés sur 8bits). Sur ce flux vidéo, deux modes d'intégration sont possibles:

- 1..... intégration analogique du signal vidéo pour créer l'image,
- 2..... comptage de photo-électron où le signal est séparé du bruit (bruit de la photocathode et aussi bruit de la vidéo) en fixant un niveau de seuil pour être ensuite empilé.

### I.B.1.d. Comparaison des techniques

Malgré des performances temporelles ultimes remarquables, les "streak camera" restent peu utilisées. Elles nécessitent une calibration temporelle critique et sont d'un prix largement supérieur aux autres techniques de détection. Cependant elles permettent avec des capteurs CCD bi-dimensionnels de réaliser en temps réel la résolution temporelle et la résolution spectrale. De plus l'évolution de cette technique est impressionnante permettant d'arriver à des caractéristiques dépassant sur beaucoup de plans les systèmes TCSPC [Hamamatsu,1991]:

- temps de montée ou de descente inférieurs à 10ps,
- absence de déformation des impulsions (dues au TTS (transit time spread) des photo-électrons des PM et aux impédances des câbles 50 $\Omega$  et de leur connectique).

Le choix entre ces techniques instrumentales dépend de beaucoup de facteurs principalement de l'intensité du signal, de la cadence, de la fenêtre temporelle et des distributions temporelles des impulsions et des sources de bruit. **La comparaison entre les systèmes de détection est difficile à réaliser car ceux-ci sont intimement dépendant de la nature de la source excitatrice. Il faut au contraire comparer les systèmes dans leur ensemble. En raison de l'utilisation des fibres optiques et du but (conception d'un FOCS atteignant la meilleure limite de détection et une identification chimique la plus complète), l'utilisation d'une source laser s'est avérée indispensable. Le choix le plus limitant n'est pas situé au niveau de la chaîne de détection mais plutôt au sein de la partie source laser. Malgré les évolutions récentes des lasers UV-Vis subnanoseconde, le choix reste limité.**

Les lasers impulsions utilisés comme source lumineuse en fluorescence ne sont pas encore très répandus dans des environnements cliniques ou industriels. Cette situation est due à leurs prix élevés mais aussi aux coûts de maintenance et à la nécessité de personnel qualifié pour maintenir l'appareillage à un niveau de fonctionnement optimum. Une des conséquences de ce constat est la faible diffusion de la FRT comme méthode d'analyse dans ces milieux. Le développement de la FRT sur ces marchés passe par l'utilisation d'une source facile à mettre en œuvre. Notre choix s'est tourné vers le laser azote mais les développements techniques récents sur les lasers solides pompé par diode laser ouvrent des perspectives nouvelles. Dernièrement Lytle et coll. [Basile,1993] ont utilisé ce type de source pour la conception d'un fluorimètre résolue dans le temps (gamme nanoseconde) avec une électronique composé d'un oscilloscope à échantillonnage. Ce prototype permet de mesurer en une seconde des concentrations de sulfate de quinine jusqu'à 10pM en cuvette sans FO. Le prototype de la source consiste en une diode laser classique émettant 2W à 800nm pompant un cristal YLF. Le fondamental (1047nm) est

doublé avec un cristal KTP (523.5nm). Le triplement en fréquence (349nm) est produit par le fondamental et le doublé dans du LBO, la séparation des trois fréquences étant réalisée par un prisme. Cette source donne des impulsions de 2.5ns de largeur temporelle (FWHM) à des cadences de 2kHz. La longueur d'onde est de 349nm avec une puissance de 1.9mW ( $1.5 \cdot 10^{12}$  photons par impulsion). Contrairement au laser azote, le faisceau est peu divergent et facile à focaliser pour des diamètres inférieurs à 50 $\mu$ m. Combinant les avantages d'un laser tout solide et d'une compacité exemplaire, cette technologie risque de s'imposer rapidement. Cependant cette source est assez onéreuse et n'est pas encore totalement arrivée au stade commercial.

#### I.B.1.e. Conclusion

Le choix du laser azote combiné avec une électronique basse cadence (20Hz) à échantillonnage en temps réel reste séduisante compte tenu de la simplicité de mise en œuvre, de la relative compacité (transportable dans une voiture et dont le remontage prend moins d'une heure) et d'un coût raisonnable.

En outre un laser azote récent (cadence: 30hz, FWHM: 0.5ns et énergie par impulsion: 150 $\mu$ J, poids de 2.85Kg (Laser 2000 S.A.)) avec une cartouche d'azote et alimenté sur batterie, est apparu sur le marché autorisant une instrumentation future encore plus compacte.

## I.B.2. Instrumentation (l'ensemble)

Notre objectif est la réalisation d'un microcapteur chimique permettant de mesurer *in vivo* et rapidement (temps de mesure inférieur à 30s) des variations relatives de concentration de corps fluorescents endogènes (NADH, composés indoliques) avec la meilleure sensibilité et sélectivité possibles. Cet objectif nous a entraîné dans la conception d'une instrumentation associée à ce capteur et à développer des méthodes d'analyse du signal spécifiques.

Abordons maintenant les choix concernant l'appareillage associé au FOCS.

### I.B.2.a. L'appareil

Abordons d'abord l'homogénéité de la chaîne instrumentale avant de s'attarder sur les spécificités de chaque élément.

#### I.B.2.a.i. Unité de l'instrument

La Figure I-4 montre l'ensemble de l'appareil. Le flux du laser azote (de longueur d'onde de 337 nm) est réfléchi sur le miroir dichroïque pour être injecté dans la FO. La FO conduit cette illumination jusqu'à la solution ou au tissu étudié. Cette même FO guide la rétrofluorescence de l'échantillon. Ce signal se situe dans le domaine spectral 380-650 nm. Le miroir dichroïque est transparent à ces longueurs d'onde. Cette fluorescence est sélectionnée spectralement par un monochromateur. Le photodétecteur est un photomultiplicateur rapide transformant le signal lumineux en signal électrique. Ce signal est alors analysé temporellement par un digitaliseur de transitoire dont la base de temps est déclenchée par la photodiode. Les données numériques sont acheminées vers un ordinateur et traitées par un programme que nous avons réalisé en utilisant les dernières avancées du domaine de l'acquisition, du traitement du signal et de la visualisation en temps réel. Cette partie électronique-informatique a été développée dans un langage iconographique de flux de donnée appelé langage G (environnement LabView de la Société National Instrument).

Les performances de l'appareil sont liées à celles des éléments primordiaux:

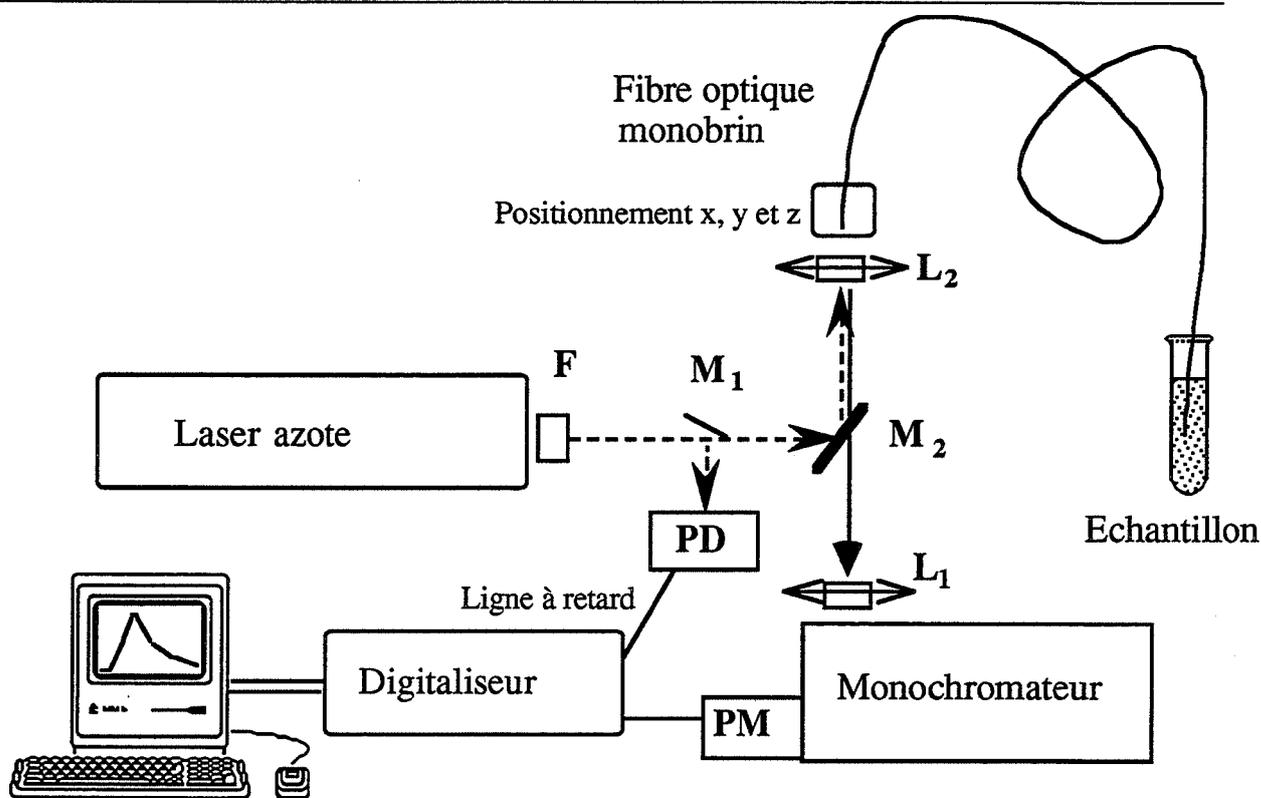
—la basse cadence (1 à 20 Hz) est liée à la fréquence du laser azote utilisé mais aussi à l'oscilloscope qui n'accepte pas des digitalisations à des cadences supérieures à 30 Hz;

—les temps mis en jeu à différents niveaux: 300 ps de mi-hauteur d'impulsion laser, temps de montée du PM (800 ps) et du module amplificateur du digitaliseur (500 ps).

**Cette cadence de quelques dizaines de Hz permet d'analyser des cinétiques rapides (inférieure à quelques secondes). Les temps de montée des appareils utilisés autorisent la mesure de fluorescence de temps de déclin supérieure à 0.8ns.**

Cette cohérence temporelle et de fréquence de répétition donne une unité nécessaire à cet assemblage, point essentiel en instrumentation. En outre l'ensemble de ce montage est

compatible avec le transport dans une petite voiture et se remonte sans problème sur un temps de l'ordre de l'heure.



**Figure I-4: Schéma de l'appareil**  
 (en trait pointillé: flux du laser; en trait plein: fluorescence;  
 F: filtre; L: lentille de focalisation; M: miroir; M<sub>2</sub>:  
 miroir dichroïque réfléchissant l'UV et transparent pour le visible;  
 PD: photodiode; PM: photomultiplicateur).

#### I.B.2.a.ii. Montage avec et sans FO

L'appareil peut être utilisé avec une FO ou de manière classique directement avec une simple cuvette. Le montage avec la cuvette consiste uniquement :

- à enlever le positionnement x,y,z de la FO et la fibre après la lentille L<sub>2</sub> ,
- à raccourcir de plusieurs mètres la ligne à retard qui relie la photodiode au digitaliseur,
- et à disposer la cuvette dans l'axe du flux laser tel que le point focal de la lentille L<sub>2</sub> soit au centre de la cuvette.

#### I.B.2.a.iii. Le laser azote

Nous avons opté pour le laser azote modèle LN 120C de PRA Laser Inc. (Canada) qui

- émet à 337.1 nm (largeur spectrale de 0.1 nm) avec une largeur temporelle à mi-hauteur de 300 ps et une cadence de 20 Hz
- donne 70 μJ/impulsion (stabilité ±5%).

La puissance crête s'élève à 250 kW avec une densité du faisceau direct de 3.5 MW/cm<sup>2</sup>. La dimension du flux est de 2×3 mm avec une divergence de 3×7 mrad (demi-angle). La consommation d'azote est de 0.1 l/min. Le poids de cette ensemble est de 8Kg. Le prix raisonnable de ce laser pour la conception d'un premier prototype a été un argument de choix.

#### I.B.2.a.iv. Le choix des fibres

Pour le domaine spectral UV-Vis trois catégories de fibre multimodale peuvent être utilisées dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau I-1 [McCann,1991].

Les FO les plus employées dans l'industrie des télécommunications sont les fibres monomodales du fait de leur faible dispersion et de leur bande passante élevée. Notre domaine d'utilisation (métrologie, lumière UV) des FO nous fait démarquer de cette tendance générale bien que dernièrement des FOCS submicroniques avec des fibres monomodales aient été réalisés [Tan,1992]. Nous verrons plus loin l'utilité d'une forte  $O_N$  et d'un diamètre en centaines de  $\mu\text{m}$  de la fibre pour le couplage flux laser-fibre et pour la collection de la fluorescence des FOCS monobrins.

Pour des diamètres de cœur supérieurs à plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$ , les FO sont multimodes c'est-à-dire que plusieurs modes sont guidés. On définit  $V$  le nombre de mode par l'équation suivante (avec  $\lambda$  et  $\rho$  la longueur d'onde et le diamètre des FO;  $n_{co}$  et  $n_{cl}$  sont les indices de réfraction du cœur et du "cladding";  $O_N$  est l'ouverture numérique) [Thompson,1991]:

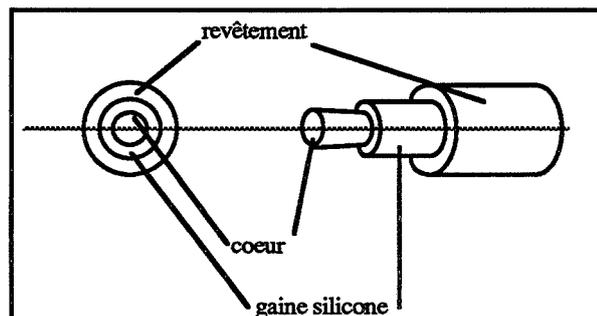
$$V = \frac{2\pi}{\lambda} \rho \sqrt{(n_{co}^2 - n_{cl}^2)} = \frac{2\pi}{\lambda} \rho O_N$$

Or les caractéristiques premières des FO que nous utiliserons sont des diamètres de cœur de 200  $\mu\text{m}$  à 1 mm et une  $O_N$  grande ( $\approx 0.4$ ).

A la longueur d'onde de 337nm, le nombre d'onde est alors supérieur à 1500.

Nous avons essayé plusieurs FO avec une excitation à 337nm. Celles qui présentaient la plus faible fluorescence et les propriétés mécaniques recherchées, sont les fibres PCS silice-silicone de la société Quartz et Silice (Paris, France). Ces FO sont constituées:

- d'un cœur en silice
- d'une gaine optique silicone
- d'un revêtement protecteur ETFE.



caractéristiques	PCS	HCS	Silice-Silice
Domaine spectral (atténuation < 1dB/m) faible taux OH <sup>-</sup> taux élevé de OH <sup>-</sup>	0.6-2.25µm: 0.25-1.3µm:	0.6-2.25µm: 0.25-1.3µm:	0.6-2.25µm: 0.2-1.3µm:
Diamètre en µm	200-1000	110-1000	50-1000
O <sub>N</sub>	0.4	0.37	0.20
Résistance aux puissances crêtes (théorique pour la Silice: 10 MW/mm <sup>2</sup> )	bonne	bonne	excellente
Résistance aux radiations	modérée	modérée	excellente
Résistance aux courbures	bonne	excellente	modérée
Finition d'embout	modérée	excellente	bonne
Dégainage	mécanique	thermique	non possible

**Tableau I-1: différentes catégories de FO:**

**PCS (polymer-Clad-Silica): cœur en silice gaine en silicone,**  
**HCS (Hard-fluoropolymer-Clad-silica): gaine en polymer dur (TECS™ de 3M),**  
**Silice-Silice: cœur en silice gaine en silice.**

La gamme de fabrication a quatre modèles: PCS 200, PCS 300, PCS 600 et PCS 1000, chacun ayant un cœur respectivement de 200, 300, 600 et 1000µm de diamètre et une ouverture numérique de 0.4. Nous avons travaillé avec deux modèles la PCS 200 et la PCS 1000. La PCS 200 a un diamètre de cœur de 200±8µm, un diamètre de gaine de 380±30µm et un diamètre de revêtement de 600±48µm.

#### I.B.2.a.v. Le couplage flux laser-fibre

Le diamètre du flux laser à coupler dans la FO étant supérieur aux diamètres des FO, il est nécessaire de focaliser la lumière laser. Pour une FO multimodale on doit avoir  $D_f < D_c$  (avec  $D_f$  et  $D_c$  diamètres du flux laser et celui du cœur de la FO). Il faut également obtenir à la sortie de l'optique de focalisation un cône contenu dans le cône d'acceptance de la fibre dont l' $O_N$  est le sinus du demi-angle. Pour cela, la focale de la lentille doit être choisie telle que:  $f \cdot \theta \leq D_c$  et  $D_f \leq 2 \cdot f \cdot (O_N)$  avec  $\theta$  la divergence du flux laser. Cette divergence est assez considérable avec un laser azote qui opère en mode super-radiant. Cette forte divergence entraîne un "beam waist" important nécessitant une focale la plus petite possible pour arriver à la première inégalité ci-dessus. Mais plus la focale est petite plus le cône de sortie de la lentille déborde le cône d'acceptance et une partie du flux laser n'est plus guidée. La nécessité d'une  $O_N$  la plus élevée se fait sentir à ce niveau. Pour une  $O_N$  donnée et une divergence du flux du laser fixée on doit calculer l'optimum de la focale de la lentille.

La position du "beam-waist", son cône et son diamètre sont des paramètres importants du couplage et d'effets indésirables. La Figure I-5 montre le chemin du flux laser à travers une FO multimodale.

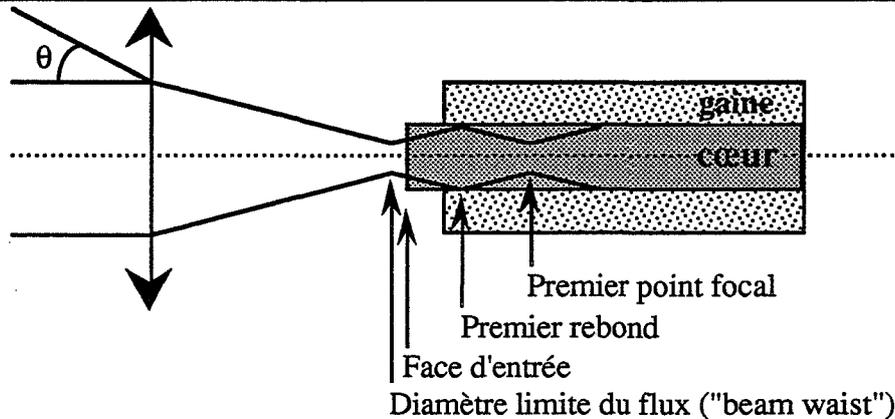


Figure I-5: zones importantes du couplage fibre-flux laser.

De plus l'utilisation de laser impulsionnel nécessite de prendre en considération certains effets indésirables comme les processus de dégradation dus aux puissances crêtes élevées et à la longueur d'onde du laser [Boulnois,1988], [DeHart,1992]. Pour le laser azote utilisé nous avons vu ci-dessus que la puissance crête était de l'ordre de 250kW soit une densité de l'ordre de 2.5 MW/mm<sup>2</sup> au niveau du "beam-waist". Ce qui n'est pas si éloigné du seuil de dommage pour la silice (densité de puissance lumineuse de 10 MW/mm<sup>2</sup>). Ainsi il est préférable d'avoir le "beam-waist" hors de la FO car si il se situait dans la FO le diamètre sera légèrement plus petit à cause du changement d'indice de réfraction entre l'air ( $n \approx 1$ ) et celui de la silice ( $n \approx 1.46$ ), ce qui augmente la densité d'énergie et le risque de dommage. Les zones de dommage se situent en trois endroits représentés sur la Figure I-5:

- la face d'entrée de la FO,
- le premier rebond,
- et le premier point focal dans la FO.

La façon de préparer la face de la FO intervient dans les risques de dommage. Le polissage laisse des impuretés et des irrégularités sur la face entraînant la formation de sites d'absorption et de réfraction nuisibles pour la FO soumise à une forte densité de puissance lumineuse. La fracture ("cleaving") d'une FO offre une surface plus propre mais néanmoins l'endroit où la fracture à été initiée présente souvent une ondulation ("ripple pattern") susceptible d'accroître l'absorption et la diffusion si la hauteur de ces ondulations sont plus grandes que la longueur d'onde du laser.

Au premier rebond, le flux lumineux rencontre la gaine avec la plus forte densité d'énergie (sauf si il y a un autre endroit où la FO est très courbée ou compressée). Plus

l'angle du cône d'entrée est important, plus forte est la densité d'énergie à ce niveau. De plus c'est l'endroit où les modes d'ordre élevé (rayons les plus divergents) quittent le cœur pour aller vers la gaine ("cladding") et la gaine de protection mécanique engendrant des risques de brûlures et des phénomènes d'interaction thermique et photochimique.

Le premier point focal est le lieu situé dans le cœur où la densité d'énergie est la plus élevée lorsque le flux est en milieu homogène. De plus il est plus large en diamètre et plus long que le "beam-waist" qui, lui, intervient hors de la fibre. L'importance de la densité d'énergie peut occasionner des destructions du matériau même. A partir de ce niveau la densité d'énergie décroît et tous les modes sont mélangés au bout de quelques mètres de FO.

#### I.B.2.a.vi. Séparation entre l'excitation et l'émission pour un FOCS monobrin

La Figure I-6 montre différentes configurations d'utilisation d'une fibre monobrin pour amener le flux d'excitation et collecter l'émission par cette même fibre [Thompson,1991]. Il est nécessaire de séparer les deux flux grâce à leurs différences en longueur d'onde ou de caractéristiques spatiales. Une différence en temps permet aussi de séparer les deux flux. Au niveau de la Figure I-6 -A, le filtre interférentiel est transparent à l'excitation et réfléchit l'émission. Pour la Figure I-6 -B, le miroir dichroïque fait exactement l'inverse. La configuration A présente quelques limites dont une sensibilité angulaire du filtre et une perte du flux laser. La configuration B est fortement marquée par les caractéristiques du filtre multicouche utilisé. Ces filtres présentent des réflexions jusqu'à plus de 99% du flux laser. Un des points non négligeable est le niveau de fluorescence de ces filtres. Les deux autres configurations utilisent un filtrage spatial. Le flux laser est généralement très bien collimaté autorisant son passage à travers un trou assez petit alors que l'émission présente une distribution conique déterminée par l'ouverture de la fibre. La configuration D n'est qu'une légère amélioration de la configuration C. Le remplacement du miroir plan par un miroir spécial élimine une lentille de collection. L'inconvénient majeur de ces systèmes est l'absence de commercialisation nécessitant une réalisation "artisanale".

Nous avons opté pour la configuration B au vu des inconvénients des autres systèmes cités ci-dessus. Le filtre de blocage UV réfléchissant modèle 614 de la société Schott est le miroir dichroïque choisi. Ses applications se situent dans le revêtement de brûleurs UV et de lampes flash. Le substrat utilisé est du verre d'épaisseur 1.6mm transmettant respectivement plus de 80% et moins de 92% pour des longueurs d'onde supérieures à 350nm et inférieures à 1000nm.

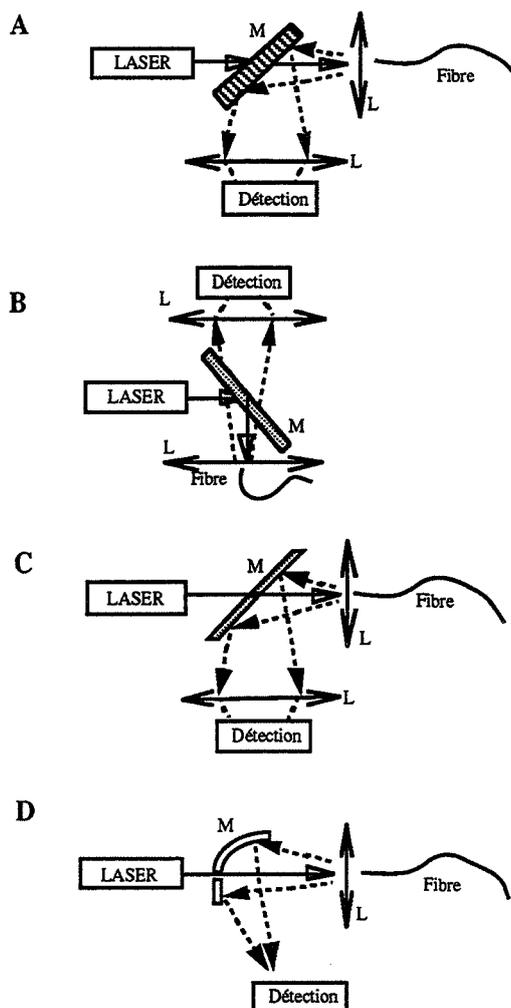


Figure I-6:

Configurations des couplages fibre-flux laser-détection. Dans les systèmes A, C, et D, le flux laser (flèche en trait plein) traverse un miroir et est injecté dans la fibre par une lentille ou un objectif (L); la fluorescence (flèche en pointillée) revenant par la même fibre est réfléchi, par le miroir (M). Dans la configuration B, le miroir dichroïque réfléchit le flux laser et laisse passer la fluorescence.

De plus ce miroir présente peu de fluorescence sous l'excitation d'un flux à 337nm. Les propriétés caractéristiques sont respectivement en transmission 1%, 10% et 50% pour les longueurs d'onde 360, 380 et 400nm. La réflexion pour des longueurs d'onde inférieures à 350nm est supérieure à 99%. Un filtre présentant une montée plus raide aurait été plus satisfaisant. D'autres modèles (611, 612 et 613) ne correspondaient pas aussi bien aux caractéristiques requises. Une fabrication spéciale (propriétés entre le 612 et le 614) aurait été plus adaptée mais très chère pour la réalisation de quelques unités.

#### I.B.2.a.vii. Filtre

Nous avons utilisé un filtre noir type UG1 de la Société Scott pour éliminer la lumière dans le visible générée par les étincelles entre les électrodes de la cavité laser (noté F sur la Figure I-4).

I.B.2.a.viii. Monochromateur

Le monochromateur utilisé est un Jobin-Yvon avec un réseau blazé à 450nm. Sa focale est de 25cm. Trois jeux de fentes ont été utilisés 0.5, 1 et 2 mm donnant respectivement une résolution spectrale de 2, 4 et 8nm.

I.B.2.a.ix. Photodiode

Le déclenchement de la base de temps du digitaliseur est assuré par une photodiode rapide modèle UV 1B de EGG.

I.B.2.a.x. Détecteur photoélectrique

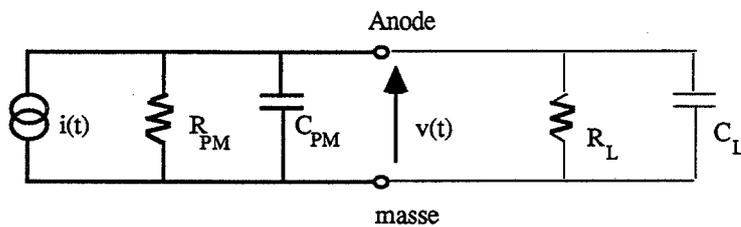
Nous avons utilisé un PM récent (commercialisé fin 1989) de la Société Hamamatsu modèle R3810 avec son boîtier précablé 50 $\Omega$  impulsionnel modèle E850-13 MOD. Ses caractéristiques sont résumées sur le Tableau I-2. La tension maximum est de 1100V. La tension que nous utiliserons sera toujours de 1000V.

Le R3810 est un PM très compact (diamètre 14.3mm; hauteur 25mm) et d'un coup modéré. Deux caractéristiques ont orienté notre choix: son gain d'une part, son temps de montée d'autre part qui le rend presque trois fois plus rapide que les PM classiques (type R928). Même les PM rapides comme le R1784 ou le R2371 n'arrivent pas à un temps de montée aussi rapide. La bande passante d'un PM se calcule avec la formule  $1/(3 \times \text{temps de montée})$  ce qui donne 420 MHz pour le R3810. Si des temps de montée plus courts s'avéraient nécessaires des galettes de micro-canaux devraient être utilisées [Kume,1988], [Kume,1992]. Ces types de détecteur (avec deux étages de galette et un gain supérieur à  $10^5$ ) permettent d'atteindre des temps de montée de 150ps (modèle R3809 de la Société Hamamatsu) [Hamamatsu,1992].

caractéristiques (température 25°C)	R3810	Unités
réponse spectrale	185-650	nm
rendement quantique (200-600nm)	>10%	
longueur d'onde à la réponse maximum	400	nm
dimension photocathode (Sb-Cs)	3*4	mm
nombre de dynodes	9	
sensibilité lumineuse anodique (SLA)	620	A/ $\ell$ m
sensibilité lumineuse cathodique (SLC) sous 1000V	55	$\mu$ A/ $\ell$ m
gain (SLA/SLC) sous 1000V	$1.13 \cdot 10^7$	
courant anodique sous 1000V	1.1	nA
temps de transit électronique	15	ns
TTS (transit time spread)	750	ps
temps de montée anodique	800	ps

Tableau I-2: Caractéristiques du PM utilisé

De plus le R3810 utilisé a été spécialement sélectionné en gain (G) et atteint sous 1000V un gain de  $1.13 \cdot 10^7$  ce qui signifie que un photo-électron généré à la photocathode donne  $1.13 \cdot 10^7$  électrons à l'anode. On a  $I_a = G I_k$  avec  $I_a$  et  $I_k$  intensités de l'anode et de la cathode. Nous avons opté pour une détection analogique sans discriminateur. Dans ce mode il faut souligner l'importance de la forme temporelle du signal conditionnée par le PM, l'amplificateur du digitaliseur ainsi que les connexions électroniques situées entre ces appareils [Pease,1988], [ThornEMI,1986]. Le circuit équivalent d'un PM avec son boîtier impulsif est le suivant, avec  $R_{PM}$  et  $C_{PM}$  résistance et capacité du PM :



Nous avons fait figurer sur le circuit équivalent du PM celui du câble ( $R_L$  et  $C_L$  résistance et capacité de charge du câble en l'occurrence). La mesure de la tension anodique dépend des deux circuits. On a  $\tau = RC$  avec  $R = \frac{R_{PM} \cdot R_L}{R_{PM} + R_L}$  et  $C = C_{PM} + C_L$ .

Or  $R_{PM} = 3.33 \cdot 10^6 \Omega$ ,  $R_L = 50 \Omega$  et  $C \approx 10$  pF donc  $\tau = 0.5$  ns.

Considérons la tension anodique quand le PM reçoit un signal lumineux qui possède un temps de déclin monoexponentiel constant  $\tau_s$ . Dans ces conditions on peut écrire avec  $e$  charge électronique et  $N$  le nombre de photoélectron [ThornEMI,1986]:

$$v(t) = NeG \frac{R}{\tau - \tau_s} (\exp(-t/\tau_s) - \exp(-t/\tau))$$

Quand  $\tau \ll \tau_s$  on parle d'opération en mode courant car la tension anodique  $v(t)$  est une fidèle représentation du courant  $i(t)$ .

Quand  $\tau \gg \tau_s$  on parle d'opération en mode tension car l'impulsion est intégrée et devient indépendante de  $\tau_s$ .

Calculons la forme temporelle d'un photoélectron (SPE) sous le mode courant. Un SPE génère  $1.12 \cdot 10^7$  électrons soit une charge de 1.794pC (avec  $e = 1.60217733 \cdot 10^{-19}$  Coulomb). Nous pouvons approximer que ceux-ci sont répartis suivant une fonction gaussienne. Le constructeur donne un temps de montée sous 1000 V de 800 ps (le temps de montée étant défini comme le temps où la fonction passe de 10% du maximum à 90%). Le problème se résume à deux équations à deux inconnues ( $I_m$  et  $\eta$  de la fonction gaussienne  $I_m \exp[-(x/\eta)^2]$ ) dont la résolution donne  $i(t) = I_m \exp(-(t/0.67)^2)$ .

La loi d'Ohm s'écrit :  $U = R I$  ( $R = 50 \Omega$ ) ce qui donne (t en ns et U en mV):

$$U(t) = 74.1 \exp\left(-\left(\frac{t}{0.672}\right)^2\right)$$

Le SPE est donc facilement mesurable avec un maximum à  $U_m=74.1$  mV.

La largeur à mi-hauteur est de l'ordre de 1 ns.

Sur la Figure I-7 nous avons rapporté l'enveloppe temporelle de quelques électrons thermiques issus de la photocathode et amplifiés sous 1000V. Le choix de prendre des électrons thermiques plutôt que des photo-électrons permet de s'affranchir de l'enveloppe de l'excitation.

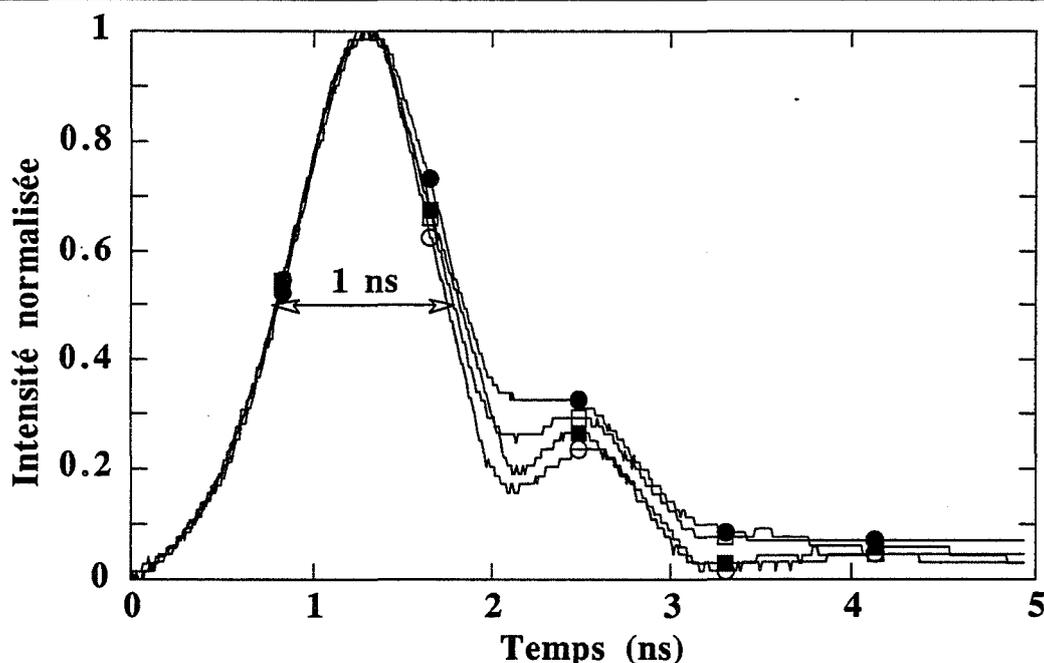


Figure I-7:

Forme temporelle expérimentale de quelques électrons thermiques sous 1000V (R3810)

Par contre ce photodétecteur présente un inconvénient lié au gain important, au temps de montée très court et à sa géométrie compacte: une zone de linéarité assez faible. Le courant crête électronique est considérable. Par exemple 20 photo-électrons/ns (ordre de grandeur:  $10 \cdot I_m \approx 30$  mA sur la dernière dynode) induit une perturbation de la répartition du potentiel entre les dynodes et particulièrement entre la dernière dynode et l'anode provoquant la saturation du PM. En outre la saturation de la photocathode intervient.

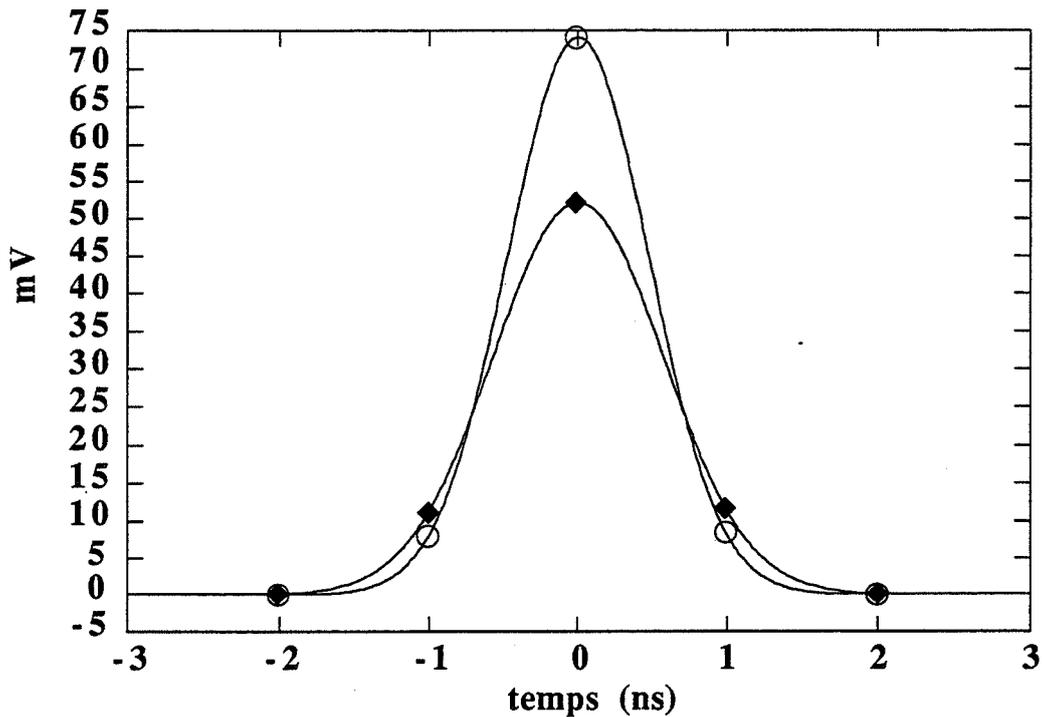
De plus se pose le problème de l'empilement de ces événements. Une autre donnée du constructeur pour le R3810 est le temps moyen de la fluctuation du temps de transit du paquet d'électrons entre la photocathode et l'anode ("transit time spread" TTS) : 0.75 ns. Le TTS est défini comme la largeur à mi-hauteur de la fréquence de distribution du temps de transit. Cette fluctuation va élargir la réponse. Calculons cette élargissement pour un empilement de 512 coups suivant notre mode d'acquisition.

On réitère l'hypothèse de la gaussienne pour la réponse du PM.

On pose que la distribution temporelle de la fluctuation du temps de transit est aussi une gaussienne (deux variables  $N_m$  et  $tts_g$ ) :  $n = N_m \text{Exp}[-(t/tts_g)^2]$ . Déterminons  $N_m$  et  $tts_g$

en sachant que l'intégrale de cette gaussienne est de 512 coups et sa largeur à mi-hauteur 0.75 ns. La résolution de deux équations à deux inconnues donne:  $tts_g = 0.375 / (-\ln(0.5))^{0.5} = 0.45$  ns. et  $N_m = 0.64$  coups/ps. On définit nos classes de fréquence : on choisi le domaine -3.75 à 3.75 ns et un pas de 15 ps, ce qui donne N égal à 500 classes.

On obtient pour une moyenne de 512 coups :  $U(t_j) = \frac{U_m N_m}{512} \sum_{i=1}^N \left[ e^{-\left(\frac{t_j - t_i}{0.672}\right)^2} e^{-\left(\frac{t_i}{0.45}\right)^2} \right]$



**Figure I-8:**  
Distributions temporelles d'un SPE (O)  
et de la moyenne des SPE empilés sur 512 coups (◆).

On voit clairement l'effet du moyennage et du TTS sur la Figure I-8:

- abaissement du maximum de 30%
- élargissement du signal : la largeur à mi-hauteur du signal renormalisé passe de 1.12ns à 1.35ns, soit une augmentation de 20%.

#### I.B.2.a.xi. Digitaliseur rapide

Nous avons utilisé le Modèle 7912 AD mainframe avec le boîtier amplificateur Modèle 7A19 et l'unité de base de temps Modèle 7B90P de la société Tektronix.

Cet oscilloscope encore appelé digitaliseur de transitoire n'est pas un oscilloscope classique. La déflexion rapide avec digitalisation par matrice de photodiodes repose sur un procédé breveté par Tektronix. Ce mode d'opération permet d'enregistrer l'ensemble

de l'enveloppe de la réponse du PM associée à chaque coup laser sur une fenêtre temporelle au minimum de 5ns ( $\approx 10$ ps par point) avec une cadence inférieure à 30Hz.

La digitalisation verticale est réalisée sur 9bits (valeur numérique maximale égal à 512). Nous avons utilisé l'amplificateur sur 50mV/div soit 400mV pleine échelle. Donc chaque bit correspond à  $\frac{50}{64}$  mV et  $\frac{1}{64}$  mA.

Lorsque l'on réalise une intégration numérique temporelle sur cette enveloppe digitalisée notée  $I_f$ , on calcule en fait une charge. Nous avons vu, dans la partie sur le PM, que la charge équivalente d'un SPE est de 1.794 pC. Le lien avec l'intégrale numérique s'exprime facilement:  $\frac{I_f}{115}$  donne le nombre de SPE équivalent ( $115 \approx 64 * 1.794$ ). Le niveau de comptage est alors égal au nombre de coups laser multiplié par ce nombre de SPE équivalent.

#### I.B.2.a.xii. Digitaliseur-Ordinateur

Le digitaliseur peut communiquer par GPIB (General Purpose Interfacer Bus; encore dénommé IEEE) avec un ordinateur. Nous avons mis en œuvre cette interface avec un ordinateur de la société Apple modèle Macintosh II CX équipé d'une carte GPIB de la société National Instrument modèle NB-GPIB. Le logiciel d'acquisition, de transfert et de traitement du signal a été développé sous l'environnement LabView de la société National Instrument.

Le digitaliseur a suffisamment de mémoire pour réaliser un moyennage interne sur 64 coups laser. Tout moyennage plus important a été segmenté en multiple de 64.

### I.B.3. Traitement du signal

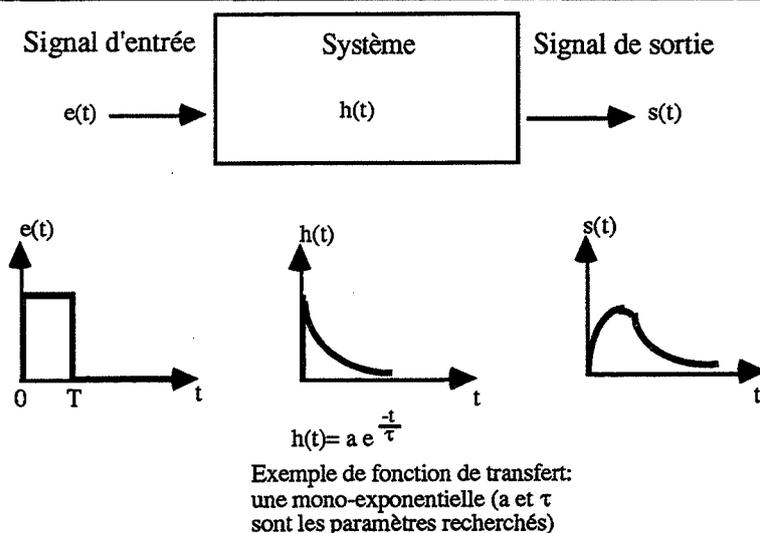
En plus des données spectrales et de l'aire intégrée du signal donnant accès à la concentration, la FRT permet de mesurer les temps de déclin de fluorescence. A cause de la largeur temporelle non nulle de l'illumination et des effets de la chaîne d'acquisition, il est nécessaire d'extraire ces temps de déclin par un traitement mathématique du signal. Ce traitement inclut des transformées en z et des identifications paramétriques.

#### I.B.3.a. Des données temporelles

##### I.B.3.a.i. Représentation système de la FRT

La Figure I-9 donne la représentation système

- d'un signal d'entrée  $e(t)$ , illumination impulsionnelle (laser),
- du système lui-même, la cinétique photophysique dont le modèle et les paramètres sont l'objet de l'étude,
- et du signal de sortie  $s(t)$ , mesure de la FRT.



**Figure I-9: Représentation schématique d'un système et de sa réponse impulsionnelle.**

##### I.B.3.a.ii. Définition de la convolution

La relation entre l'entrée causale et la sortie d'un système linéaire peut s'écrire sous forme d'équation différentielle mais aussi sous la forme intégrale ( $s(t) = \int_0^t h(t-x) e(x) dx$ ) dite convolution de  $e(t)$  et  $h(t)$  et notée symboliquement  $s(t) = e(t) * h(t)$ . Pour chaque valeur de  $t$ , le calcul de la sortie  $s(t)$  s'obtient par une intégrale sommant de 0 à  $t$ .

##### I.B.3.a.iii. Transformée en z

Les transformées de Laplace et de Fourier sont très connues mais ne s'appliquent que pour des signaux continus dans le temps [Lifermann, 1975], [Gille, 1988]. Pour notre instrument nous avons des signaux discrets dans le temps: le digitaliseur discrétisant et

transformant ainsi un signal continu dans le temps en une séquence de nombres qui se succèdent à des intervalles de temps réguliers (définie comme suite indicée par  $k$ :  $s(k)$ ). La transformée en  $z$  (encore appelée, en Europe, transformée en  $\gamma$  avec  $\gamma = \frac{1}{z}$ ) est l'équivalent de la transformée de Laplace pour des suites.

#### I.B.3.a.iv. Convolution avec la transformée en $z$

La convolution de  $e(k)$  et  $h(k)$ , notée  $\{s(k)\} = \{e(k)\} * \{h(k)\}$ , s'écrit

$$s(k) = \sum_{i=0}^k e(i) h(k-i).$$

Pour chaque valeur discrète d'indice  $k$ , le calcul de la sortie  $s(k)$  est donné par une sommation sur  $k$  multiplications. Pour une discrétisation sur 510 termes opérée par le digitaliseur, le calcul numérique de la suite  $\{s(k)\}$  nécessite donc 130 305 multiplications et le même nombre d'additions.

#### I.B.3.a.v. Fonction de transfert de la FRT

La fonction de transfert de la fluorescence peut s'exprimer classiquement comme une combinaison linéaire d'exponentielles (distribution discrète de  $n$  temps de déclin  $\tau_i$ ):

$$h(t) = \sum_{i=0}^n a_i e^{-t/\tau_i}.$$

Lorsque les solutions sont complexes, une distribution des temps de déclin est à déterminer. Pour le premier cas on cherche alors à trouver les valeurs de  $a_i$  et  $\tau_i$  par la méthode des moindres carrés [Grinvald, 1974], [Grinvald, 1976]. La deuxième approche nécessite des calculs plus longs et des algorithmes plus complexes; de plus l'interprétation des distributions reste un sujet controversé [Livesey, 1987]. Nous sommes restés dans le traitement classique de l'identification des  $a_i$  et  $\tau_i$  par la méthode des moindres carrés utilisant l'algorithme Levenberg-Marquardt.

Il faut souligner, ici, la difficulté d'analyser et d'identifier le nombre  $n$  de temps de déclin ainsi que la détermination des paramètres  $a_i$  et  $\tau_i$ . Cette difficulté vient déjà du modèle mathématique. Sur la Figure I-10 deux bi-exponentielles ( $\{1\}$  et  $\{2\}$ ) sont reportées:

- $\{1\}$   $0.75 \exp(-t/5.5) + 0.25 \exp(-t/8)$
- $\{2\}$   $0.25 \exp(-t/4.5) + 0.75 \exp(-t/6.7)$ .

Ces deux fonctions mathématiques présentent une faible différence puisque la différence relative encore dénommée résidu relatif ( $\{1\} - \{2\} / \{1\}$ ), est inférieure à 2% sur la plage 0-20ns. Même avec des méthodes performantes comme TCSPC, l'incertitude expérimentale intégrant les différents bruits de la mesure de la fluorescence est supérieure à ce résidu [Grinvald, 1974]. A la vue de cet exemple, il est clair que l'unicité de la forme analytique de la fonction de transfert n'est pas évidente pour plus de deux exponentielles.

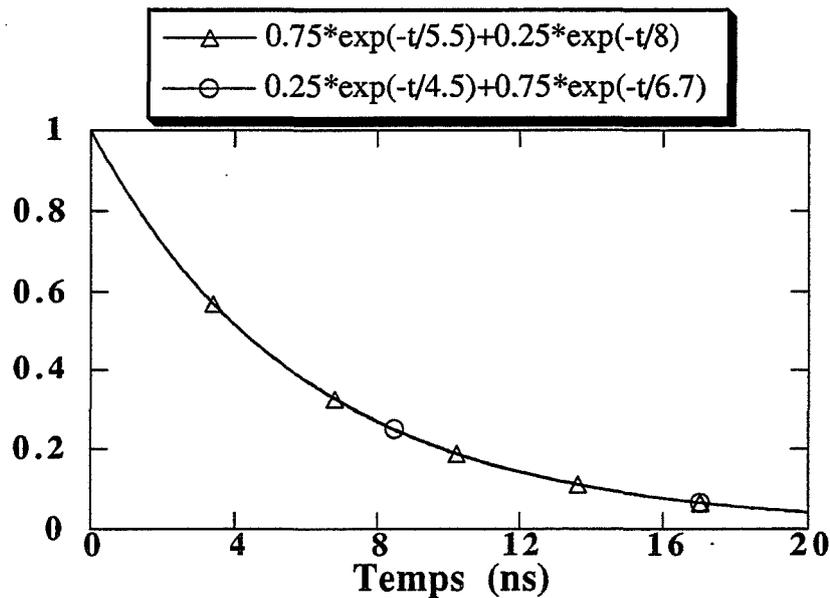


Figure I-10: Représentation de deux bi-exponentielles.

Cette difficulté intrinsèque de l'analyse des temps de déclin donne une limite à la quantité et à la pertinence des informations que l'on peut obtenir à partir de ce traitement. Il faut toutefois remarquer que la situation est beaucoup moins délicate si les temps de déclin diffèrent nettement ce qui est souvent le cas. En outre l'analyse des temps de déclin de fluorescence dans la gamme nanoseconde est rendue plus ardue à cause de la durée non négligeable de l'impulsion lumineuse excitatrice et des temps de réponse des électroniques de détection.

#### I.B.3.a.vi. Identification paramétrique de la FRT

Si l'impulsion lumineuse et les temps de réponse des électroniques sont bien plus rapides que les temps de déclin de fluorescence alors le signal mesuré a la forme de la fonction de transfert et par l'optimisation avec les moindres carrés, l'identification paramétrique est directe sous réserve des problèmes d'unicité soulevés ci-dessus. Sinon la méthode de convolution et d'analyse par les moindres carrés sont à utiliser. Dans ce cas, qui se révèle le plus courant, le calcul de  $\{s(k)\} = \{e(k)\} * \{h(k)\}$  nécessite l'accès à la forme temporelle de l'IRF (Instrument Response Function)  $e(k)$ .

Les techniques d'acquisition de cette enveloppe temporelle et des méthodes de convolution sont abondamment traitées dans la littérature [Grinvald, 1974], [O'Connor, 1984], [Castelli, 1985]. Nous avons assimilé l'IRF à l'impulsion laser acquise avec notre chaîne de détection incluant les réponses temporelles du PM et du digitaliseur rapide.

La Figure I-11 présente la forme temporelle d'un IRF enregistré par cette technique. La largeur à mi-hauteur (FWHM) est de 1.6 ns. La FWHM de l'IRF est à rapprocher de celle de l'électron thermique généré par le R3810 (1ns). Cette élargissement considérable (60%) est la conséquence des convolutions successives (impulsion laser (FWHM 300ps), réponse de l'électronique).

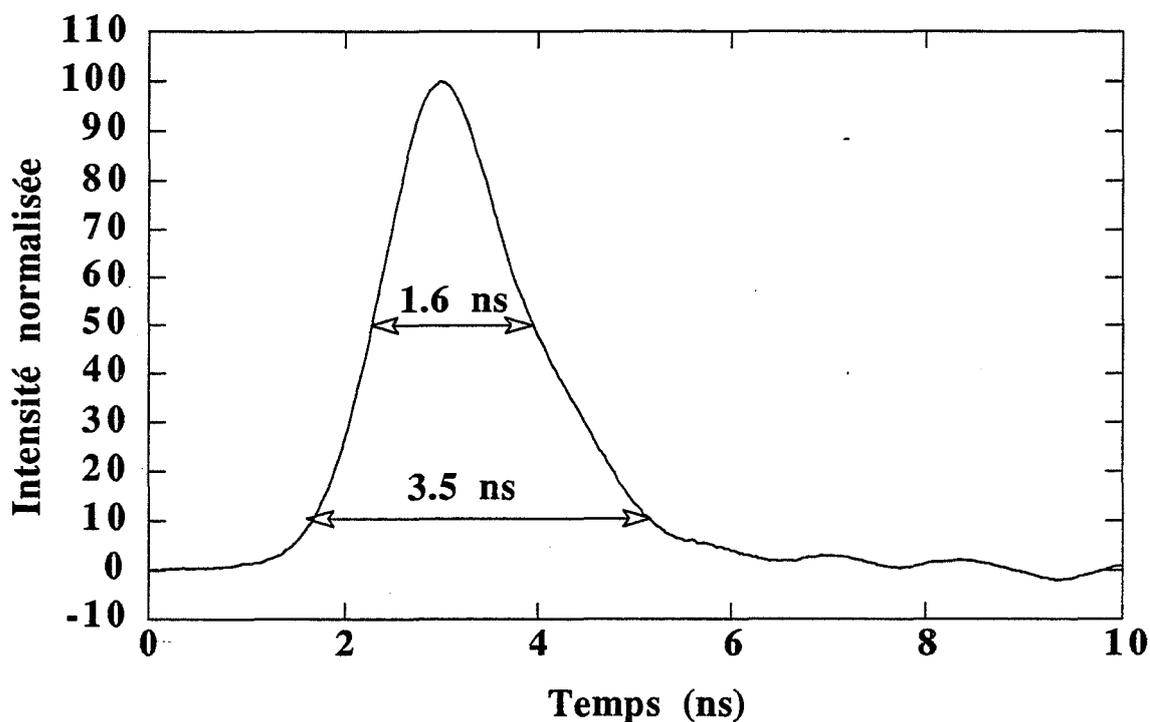
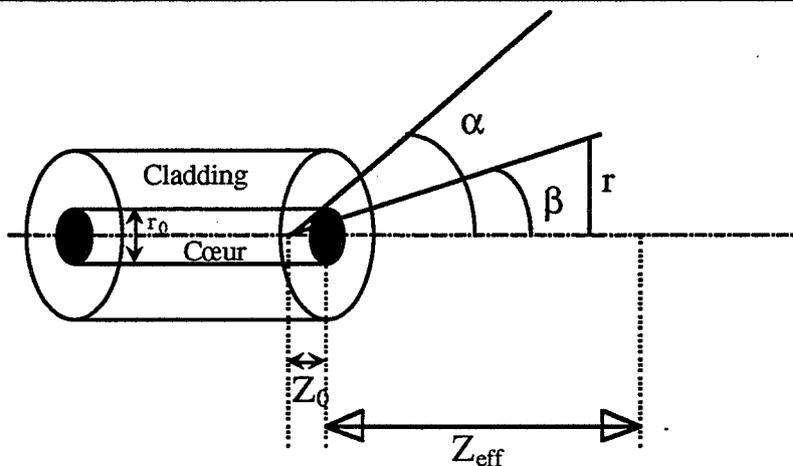


Figure I-11: Forme temporelle typique d'un IRF associé à notre système

### I.B.4. Théorie du FOCS monobrin en RFF

Une comparaison expérimentale entre les configurations bi-fibre et monobrin montre que ces deux systèmes ont chacun leurs avantages et inconvénients et s'adressent à des applications qui n'ont pas les mêmes objectifs (compacité, rapport signal sur bruit...) [Louch,1988]. Récemment une étude théorique des deux systèmes a été publiée [Zhu,1992]. Celle-ci aborde essentiellement la quantification de l'efficacité de la collection de la fluorescence du volume à analyser suivant les géométries développées.

Lorsque l'on développe un FOCS *in vivo*, l'une des questions primordiales est "quelle est la taille réelle du volume excité et/ou vu c'est-à-dire de la dimension de la région analysée?". D'autres considérations concernant soit d'autres phénomènes interférents (absorption, diffusion) soit des propriétés de matériaux intervenant doivent être prises en compte pour connaître le volume analysé réel. En spectrofluorimétrie classique, les dimensions du volume sont facilement évaluées en fonction des tailles des flux d'excitation et d'émission et des couplages utilisés. Par contre la détermination du volume sondé par un FOCS est plus complexe.



**Figure I-12:**

**Notations des variables de calcul du volume sondé par un FOCS utilisant la RFF.**

La Figure I-12 montre les notations en vue du calcul du volume sondé. La fluorescence est excitée et émise à partir d'un volume  $dV$ :  $dV = dS dz$

$$\text{avec } dS = 2\pi r dr = 2\pi (z_0 + z)^2 \frac{\tan \beta}{\cos^2 \beta} d\beta.$$

Avec  $r_0$  le rayon du cœur de la fibre et  $\alpha$  l'angle d'acceptance c'est-à-dire  $\sin \alpha = O_N$  ( $O_N$  étant l'Ouverture Numérique), on écrit:  $z_0 = \frac{r_0}{\tan \alpha}$ .

Si l'absorption est faible le signal de fluorescence intégré sur ses bornes 0 et  $\alpha$  noté  $dF(z)$  est exprimé par [Zhu,1992]:

$$dF(z) = F(\alpha) \frac{dz}{(z+z_0)^2}$$

$$\text{avec } F(\alpha) = r_0^2 \phi \varepsilon C \frac{\pi\alpha}{2} \int_0^\alpha E_e(\beta) E_c(\beta) \frac{\tan\beta}{\cos^2\beta} d\beta.$$

$\phi$  est le rendement quantique de fluorescence;  $\varepsilon$  le facteur d'extinction molaire;  $C$  la concentration;  $E_e(\beta)$  et  $E_c(\beta)$  correspondent respectivement à la distribution angulaire du flux excitateur et à celle du flux collecté (pour des FO monomodes le flux excitateur est gaussien c'est-à-dire de la forme  $I_e(z,r) = I_e(z,0) e^{-r^2/k(z)}$ , pour des fibres multimodes une distribution multi-gaussienne noté  $E_e(\beta)$  doit être utilisée; par analogie avec la séparation des variables on définit une fonction  $E_c(\beta)$  pour le flux collecté).

$$\text{Soit } F_T \text{ le signal total de fluorescence: } F_T = \int_0^\infty dF(z).$$

$$F_T = \frac{F(\alpha)}{z_0}.$$

Ainsi  $F_T$  est proportionnelle à  $r_0$ : plus le diamètre du cœur est grand, plus le signal est important.

Définissons les grandeurs adimensionnelles qui caractérisent l'efficacité du système:

$$x = \frac{z}{z_0}$$

$R_F(x)$  le rapport entre le signal collecté sur la longueur  $z$  (correspondant à  $x$ ) et  $F_T$ .

On obtient une relation très simple:

$$R_F(x) = \frac{x}{1+x}$$

Avec les hypothèses précédentes, l'efficacité  $R_F(x)$  est indépendante des paramètres photophysiques (absorption, rendement de fluorescence) et des distributions spatiales des flux. Elle ne dépend que du rayon du cœur et de l' $ON$ .

On collecte 90% du signal total pour  $x=9$  soit

$$z_a = 9 \frac{r_0}{\tan \alpha}$$

$z_a$  est proportionnel à  $r_0$ . La Figure I-13 montre la relation entre l' $ON$  et  $z_a$  pour des fibres de 100  $\mu\text{m}$  de rayon. Plus l'ouverture est grande plus  $z_a$  est petit.

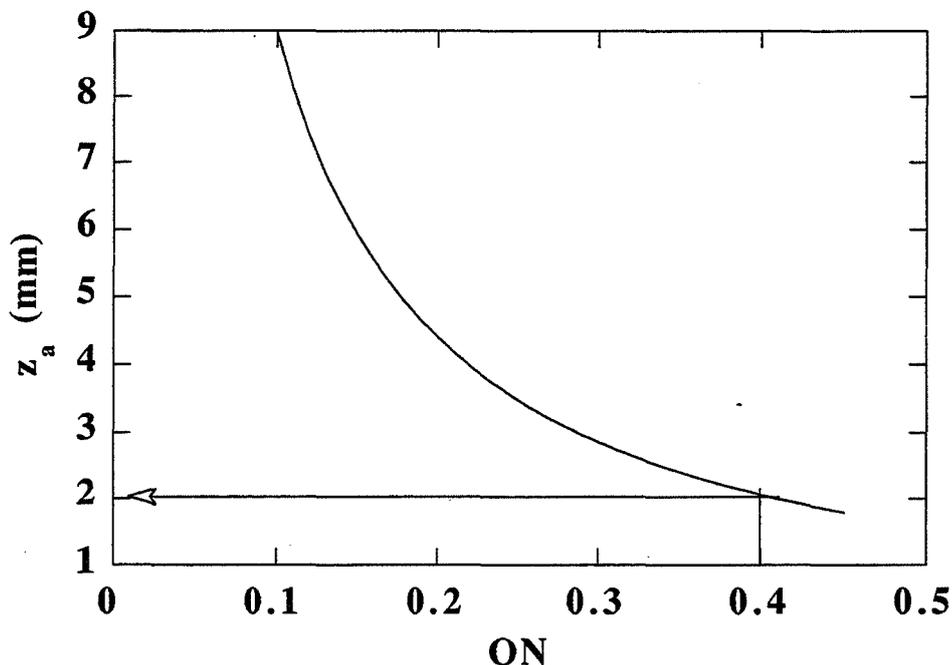
Si l'on tient compte maintenant des absorptions des flux excitateur et émis:

$$K = K_{ex} + K_{em} \text{ avec } K_{ex} = \varepsilon_{ex} C_{ex} \text{ et } K_{em} = \varepsilon_{em} C_{em}.$$

L'efficacité  $R_F(x)$  s'écrit [Zhu,1992]:

$$R_F(x) = \frac{\int_0^x \frac{10^{-z_0 K x}}{(1+x)^2} dx}{\int_0^{\infty} \frac{10^{-z_0 K x}}{(1+x)^2} dx}$$

Cette équation nécessite un calcul numérique par évaluation des intégrales. Dans le cas où les inverses des  $K_i$  sont au moins dix fois inférieures à la longueur  $z_0$ , l'équation précédente de  $R_F$  est suffisante.



**Figure I-13:**  
Longueur en mm définissant le volume d'où 90% du signal est issu en fonction de l'ouverture numérique pour des FO multimodes de 100  $\mu\text{m}$  de rayon.

Dans la pratique ces calculs sont limités au FOCS *in vitro* et dans des solutions limpides ne présentant pas de diffusion. La mesure *in vivo* est réalisée au sein du tissu ou de liquides biologiques comme le sang qui sont des systèmes hétérogènes et diffusants. Les calculs du trajet lumineux dans les tissus abordés au chapitre "Mesure *in vivo*" montrent que les tissus sont beaucoup plus diffusants qu'absorbants empêchant l'utilisation de la loi de Beer Lambert. En solution limpide la mesure de 90% du signal de fluorescence provient du cône de longueur de 2mm pour la FO utilisée d' $O_N$  de 0.4 et de diamètre de 200 $\mu\text{m}$  (Figure I-13). *In vivo* cette mesure proviendrait plus réellement d'une tranche tissulaire cérébrale d'une profondeur de l'ordre de 200 $\mu\text{m}$  [Chance,1962].

### I.B.5. Appareils auxiliaires utilisés au cours de ce travail

Nous présentons sommairement les appareils du commerce utilisés lors de ce travail. Je tiens à remercier ici tous ceux qui m'ont accueilli et qui ont rendu disponible leurs appareillages et pris du temps pour permettre de réaliser ces mesures.

#### I.B.5.a. Spectrophotomètre

L'appareil utilisé est un double faisceau de la société Kontron modèle 860 du Laboratoire CPPI de l'Ecole des Mines de St-Etienne.

#### I.B.5.b. Spectrofluorimètre continu

Nous avons employé pour les mesures *in vitro* de la 5-HT un spectrofluorimètre de la société PSI mis à ma disposition par la société Kontron.

Les mesures *ex vivo* du LCR ont été effectuées sur un spectrofluorimètre modèle F4500 de la société Hitachi du Laboratoire de radiobiologie du Centre de Recherche du Service des Santé des Armées de Grenoble. Je remercie particulièrement Monsieur le Directeur du Laboratoire de radiobiologie Fatome, M. pour son accueil chaleureux.

#### I.B.5.c. Spectrofluorimètre résolu dans le temps

La FRT du 5-HT à différentes longueurs d'onde d'excitation a été étudiée avec le fluorimètre modèle 299T de la société Edinburgh Instrument équipé avec une lampe flash à azote. Les largeurs spectrales d'excitation et d'émission ont été fixées à 10 nm et 20 nm respectivement.

Je tiens tout spécialement à remercier Monsieur le Docteur Talbot, J.C. de L'Université de Bordeaux pour son aide et son amitié.

## **Chapitre II:**

### **MESURE *IN VITRO* DE LA 5-HT**



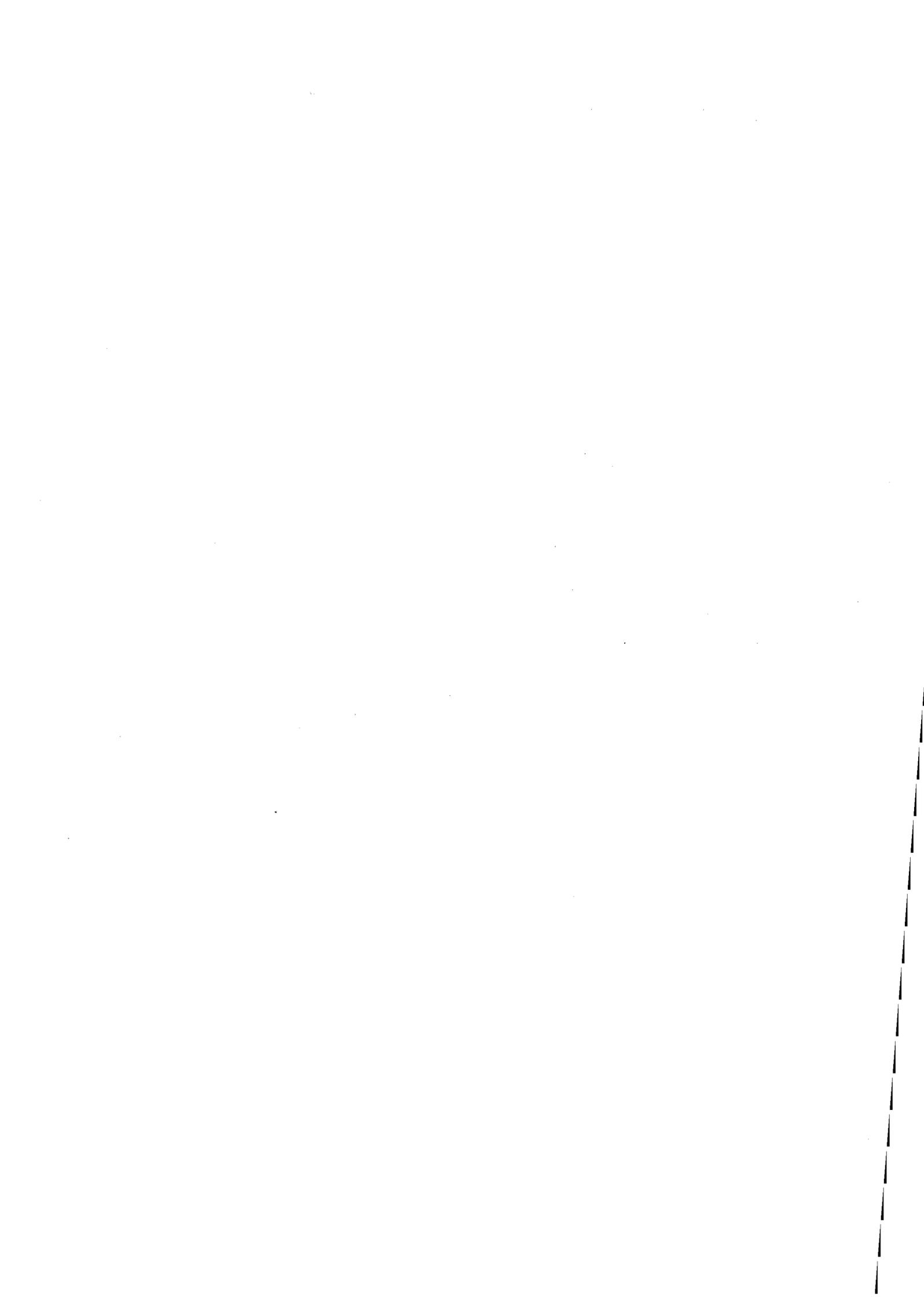
## RÉSUMÉ

Nous présentons la mesure *in vitro* d'un neuromédiateur, la sérotonine (5-HT) et de son métabolite, l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA), par un microcapteur chimique à fibre optique (FOCS).

Les propriétés photophysiques de la 5-HT sont analysées: un état émissif de la 5-HT non décrit dans la littérature a été mis en évidence. Cette nouvelle émission est centrée sur 390 nm avec un temps de déclin de 1 ns. L'autre bande de fluorescence, connue depuis plus de 30 ans, est située à 340 nm avec un temps de déclin de 2.7 ns. En utilisant les fluorescences, statique et résolue dans le temps, les effets spectraux et temporels de la longueur d'onde d'excitation ont été étudiés entre 285 nm et 340 nm. De plus des calculs semi-empiriques (CNDO/s et ZINDO) de l'absorption UV de la 5-HT ont permis de clarifier ses propriétés photophysiques.

Les mesures d'interférents (5-HIAA) ont été réalisées: la fluorescence du 5-HIAA est au moins dix fois moindre que celle du 5-HT. Les indoles comme la tryptamine ne présentent pas de fluorescence mesurable avec une excitation à 337 nm ce qui donne une spécificité de notre signal pour la classe des 5-OH.

La limite de détection actuelle du FOCS réalisé pour la mesure de 5-HT se situe à 5  $\mu$ M. Une discussion sur l'instrumentation et sur les divers traitements du signal, propose des orientations autorisant la mesure *in vivo* du niveau basal de la 5-HT cérébrale ( $\approx$ 1 nM).



## II. Mesure *in vitro* de la 5-HT

### II.A. Introduction

En 1947, Rapport et coll. isolèrent une substance vasoactive qu'ils appelèrent sérotonine (5-HT) en raison de sa présence dans le sérum et de son pouvoir vasoconstricteur [Rapport,1947]. Lorsqu'elle fut découverte dans le cerveau [Twarog,1953], sa participation en tant que neurotransmetteur à l'élaboration des grandes fonctions cérébrales fut déjà soupçonnée. L'apparition des premières techniques pharmacologiques liées à son métabolisme, suscita une série de travaux qui rapidement démontrèrent la place importante de cette molécule dans le cycle veille-sommeil. A ces premières découvertes succéda une histoire de plus de trente ans entre la 5-HT et le sommeil [Sallanon,1989], [Houdouin,1991], [Jouvet,1992].

Les méthodes de mesure *in vivo* sur l'animal libre des variations relatives des concentrations de 5-OH (composés 5-hydroxyindoliques) ont permis une analyse plus profonde des mécanismes des cycles de la vigilance. Ces méthodes sont divisées en deux catégories [Kalén,1988], [Knott,1988]:

- la voltamétrie
- la dialyse .

La meilleure résolution anatomique est obtenu par la voltamétrie grâce à la finesse des microélectrodes (20 à 40 $\mu$ m). Le principe de cette technique consiste dans la mesure du courant d'oxydation produit par des substances oxydables et consécutif à l'application d'un potentiel variable. La principale limitation de cette technique consiste à mesurer essentiellement l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5-HIAA) et pas la 5-HT [Cespuoglio,1986]. Par contre des techniques avec des membranes comme la dialyse permet une spécificité chimique exemplaire. Cette technique repose sur la succession d'une étape de dialyse et d'une séparation des composés par chromatographie et finalement d'une mesure électrochimique, fluorimétrique ou radioenzymatique. Cependant cette technique présente de nombreux inconvénients [Kalén,1988]:

- mauvaise résolution anatomique causée par la taille millimétrique de la membrane de dialyse,
- dommages tissulaires liés aux flux de dialyse (beaucoup moins prononcés que ceux générés par les techniques "push-pull" sans dialyse),
- intervalles de temps entre deux mesures consécutives supérieurs à 15 minutes en raison des temps de diffusion passive et d'équilibre physico-chimique mais aussi de la nécessaire collection d'une quantité minimale détectable.

Au vu de ces limitations liées à la nature des phénomènes, les simples améliorations techniques ne suffisent pas et une technologie alternative s'avère nécessaire pour atteindre une mesure rapide (<30s) sélective (5-HT dans la classe des 5-OH) et réalisable chez l'animal libre avec une résolution anatomique sub-millimétrique.

Ainsi nous nous sommes orientés vers le développement d'une technologie résolument différente des systèmes électrochimique ou de dialyse: les capteurs chimiques à fibre optique dont nous avons esquissé les différents aspects au chapitre précédent.

### II.A.1. Rappels concernant la 5-HT *in vivo*

La mesure de la 5-HT *in vitro* avec un capteur chimique extrinsèque à fibre optique constitue la première étape de faisabilité précédant celle de la mesure *in vivo*. Étudions rapidement dans quelles conditions la 5-HT devrait être mesurée *in vivo* pour en dégager certains impératifs métrologiques (sélectivité, sensibilité...).

#### II.A.1.a. Métabolisme de la 5-HT

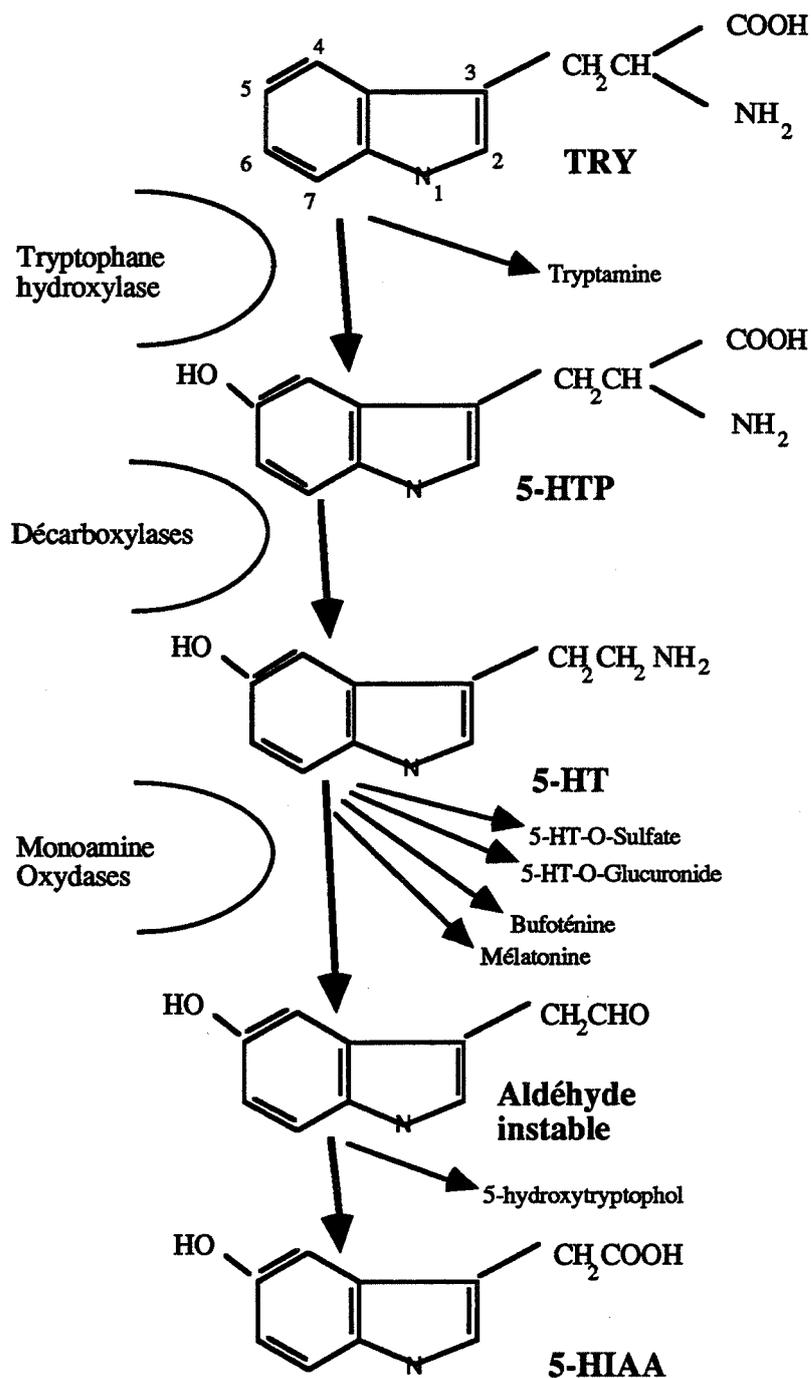
##### II.A.1.a.i. Biosynthèse de la 5-HT

La 5-HT est synthétisée à partir du tryptophane, un acide aminé essentiel, en deux étapes [McGeer,1978]:

- l'hydroxylation du tryptophane sur le carbone 5 du noyau indole, générant le 5-HTP (le 5-hydroxytryptophane)
- la décarboxylation du 5-HTP qui aboutit à la 5-HT ( Figure II-1).

La 5-HT cérébrale est synthétisée exclusivement par l'hydroxylation du Tryptophane cérébral apporté par la circulation sanguine. La Tryptophane-5-hydroxylase EC 1.16.4 (TPOH) est l'enzyme de cette réaction. Elle est spécifique des neurones sérotoninergiques. Cette première étape est limitante. Un outil pharmacologique permettant d'agir à ce niveau métabolique est la p-chlorophenylalanine (PCPA) qui inhibe la TPOH [Koe,1966].

La décarboxylation du 5-HTP est réalisée par une enzyme non spécifique des neurones sérotoninergiques, la L-aromatique-amino-acide aromatique décarboxylase EC 4.1.1.28 (ou encore Dopa décarboxylase car elle intervient dans la décarboxylation de la Dopa en Dopamine). Cette étape n'étant pas limitante, le 5-HTP est un intermédiaire présent *in vivo* seulement en très faible quantité. Cette enzyme peut être inhibée de manière spécifique par le Benserazide [Carlsson,1970].



**Figure II-1:**  
Schéma de la biosynthèse de la 5-HT  
et des autres voies mineures de son métabolisme

#### II.A.1.a.ii. Dégradation de la 5-HT

La dégradation de la 5-HT est réalisée par sa déamination oxydative en deux étapes [McGeer, 1978]. En premier lieu la 5-HT est transformée en 5-hydroxyindol acétaldéhyde par les monoamines oxydases EC 1.4.3.4 (MAO), enzyme mitochondriale associée à la membrane externe des mitochondries. Une classe de composé inhibant cette enzyme est

répertoriée sous la dénomination IMAO (inhibiteur des MAO). Cet aldéhyde est très labile et se convertit en deux dérivés stables : majoritairement en 5-HIAA de façon irréversible, et en 5-hydroxytryptophol réversiblement. En situation normale, le 5-HIAA constitue le catabolite majeur de la 5-HT. Le 5-HIAA cérébral est éliminé par un mécanisme actif.

#### II.A.1.b. Les niveaux de concentration de 5-HT, des 5-OH et du tryptophane

Le modèle traditionnel de la transmission de l'information dans le SNC met en jeu des neurotransmetteurs libérés par les terminaisons axonales au niveau d'une synapse spécialisée où les neurones pré- et post-synaptiques sont en contact très étroit. En considérant les études sur la libération de la 5-HT [Houdouin,1991] elle agit de deux façons:

- comme un neurotransmetteur classique, rapidement et localement,
- comme une neurohormone, lentement et à distance.

La fonction de neurotransmetteur jouée par la 5-HT implique qu'elle soit libérée dans l'espace extracellulaire.

Au niveau des quantités tissulaires des 5-OHs dans le cerveau, les premières mesures ont été réalisées dès 1956 [Maickel,1968]. Pendant les années soixante les procédures d'extraction combinées aux avancées des techniques d'analyse chimique ont permis d'atteindre des mesures de 5-HT dans des zones cérébrales de poids inférieur à 100 mg [Maickel,1968]. Au niveau du cerveau de rat en entier les quantités de 5-HT sont de 0.5 µg/g de tissu (≈2.5 nmole/g de tissu). Pour le cortex, le bulbe, le mésencéphale et l'hypothalamus/thalamus, on a respectivement 0.35 µg/g de tissu (≈1.75nmole/g de tissu), 1.03 (≈5.15), 1.23 (≈6.15) et 1.29 µg/g de tissu (≈6.45) avec des erreurs inférieures à 10% [Maickel,1968]. Plus récemment les niveaux de 5-HT tissulaire ont été réexaminés dans six zones, le Cx frontal, le colliculus inférieur, l'hippocampe, le n. caudé, l'hypothalamus et le nRD [Adell,1991]. Pour les cinq premières zones, des valeurs comprises entre 1 et 1.5 nmole/g de tissu ont été mesurées. Pour le nRD des valeurs plus élevées sont données:  $3.9 \pm 0.9$  nmole/g de tissu. Pour les précurseurs de 5-HT et sous réserve d'une alimentation normale, les quantités tissulaires globales pour le cerveau de souris de Tryptophane et de 5-HTP sont respectivement de l'ordre de 10 µg/g de tissu (≈50nmole/gr de tissu) et inférieure à 0.05 µg/g de tissu (≈0.25 nmole/g de tissu) [Carlsson,1972]. Pour les métabolites, le 5-HIAA et le 5-HTOL, des valeurs en nmole/g de tissu pour 5-HIAA et en pmole/g de tissu pour 5-HTOL chez le rat sont de 1.4 et 23, pour le Cx occipital, 2.6 et 100 au niveau du Cx frontal et de 5.9 et 87 pour le nRD [Beck,1987]. Adell [Adell,1991] donne chez le rat des valeurs comprises entre 0.5 et 1 nmole/g de tissu pour le Cx frontal, le colliculus inférieur, l'hippocampe, le n. caudé et l'hypothalamus et  $3 \pm 1.3$  nmole/g de tissu pour le nRD.

Dans le LCR le premier dosage des 5-OHs a été réalisé par Ashcroft en 1960 [Ashcroft,1960]. Ces résultats montrent une plus faible quantité des 5-OHs (3 fois moins) chez les patients souffrant de dépression (les concentrations globales des 5-OHs sont mesurées: 32ng/mL ( $\approx$ 161nM)). Ce fut le point de départ de la corrélation 5-OHs dépression. Plus tard à la fin des années soixante la corrélation 5-OHs variation des états de vigilance est obtenue [Jouvet,1969]. Les mesures du 5-HIAA sont réalisées en fonction de l'état de vigilance dans le LCR de chat prélevé au niveau de la citerne [Radulovacki,1973], [Buckingham,1975]. Ces moyens analytiques sont toujours employés avec des améliorations techniques (HPLC) [Knott,1988]. Avec ces progrès la concentration de 5-HIAA basal dans le LCR ventriculaire a été mesurée à 2.5  $\mu$ M.

Nous nous intéressons maintenant aux niveaux extracellulaires de 5-HT et 5-HIAA dans diverses régions cérébrales (mesurés par dialyse), les autres composés 5-OHs intervenant dans le métabolisme du 5-HT sont essentiellement intracellulaires. Pour six zones d'intérêt sérotoninergique (le Cx frontal, le colliculus inférieur, l'hippocampe, le n. caudé, l'hypothalamus et le nRD) le niveau basal de 5-HT reste à des concentrations comparables avec des valeurs moyennes situées entre 1 et 2 nM (dans le nRD et le Cx frontal les valeurs sont 40% plus élevées que dans les autres zones) alors que le niveau basal de 5-HIAA est beaucoup plus dépendant de la zone étudiée allant de  $6000\pm 1000$  nM pour le nRD, à  $3000\pm 500$  nM pour le n. caudé et l'hypothalamus et à 1500-2000 nM dans les autres zones [Adell,1991].

Pour les différents travaux évoqués ci-dessus les ordres de grandeur sont respectés. En final, les niveaux tissulaires de 5-HT et 5-HIAA sont comparables tandis que pour les niveaux extracellulaires les rapports 5-HIAA / 5-HT s'élèvent de 1000 à 3500. En outre le rapport 5-HT tissulaire / 5-HT extracellulaire va de 2880 dans le nRD à 740 dans le Cx frontal [Adell,1991]. Le niveau nanomolaire de 5-HT, quelle que soit la zone explorée (et donc indépendamment de la teneur tissulaire), témoigne d'un processus de contrôle et de régulation très efficace de ce niveau de concentration.

A cause de cette régulation très efficace assurant un niveau très faible de 5-HT par rapport à celui du 5-HIAA, la mesure *in vivo* de celle-ci s'avère difficile. Ce qu'il faut donc retenir ici ce sont les ordres de grandeur des concentrations extracellulaires ou endogènes de 5-HT et 5-HIAA dans différentes régions du cerveau du rat qui se situent respectivement dans des gammes de 1nM à 100nM et 100nM à 5 $\mu$ M.

## II.B. Propriétés photophysiques de la 5-HT

Les propriétés photophysiques de la 5-HT sont dues principalement au noyau indole hydroxylé en position cinq. Désirant mesurer le plus sélectivement possible la 5-HT par un capteur à fibre optique, nous mettrons en relief ses propriétés les plus spécifiques au regard des composés indoliques (tryptophane, tryptamine) et des autres composés de la classe des 5-OHs, et plus particulièrement du 5-HIAA.

### II.B.1. Généralités sur les 5-OHs

Au pH physiologique de 7.4, le radical amine de la 5-HT est sous la forme  $\text{NH}_3^+$  et le 5-HIAA sous la forme d'ions  $\text{COO}^-$ . Les  $\text{pK}_a$  (constantes d'équilibre acide-base) de certains 5-OHs sont donnés au Tableau II-1.

nom	R	$\text{pK}_a$	
		lié au groupe 5-hydroxy	lié à R
5-hydroxyindole	H	11.1	
5-HT	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	11.1, 11.2	9.8
5-HIAA	$\text{CH}_2\text{COOH}$	11.4	4.75
5-HTP	$\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$	11.4	2.38, 9.39

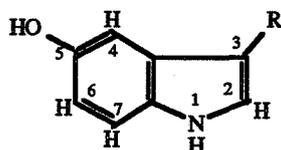


Tableau II-1: Valeurs des  $\text{pK}_a$  des 5-OH  
(issu de [Jovanic,1990])

### II.B.2. Rappels sur les notations $^1L_a$ et $^1L_b$

La classification des spectres d'absorption UV-Visible des hydrocarbures cata-condensés (molécules aromatiques où aucun des carbones ne fait partie de plus de deux noyaux) a été entreprise par Platt [Platt,1949]. Il a utilisé le modèle de l'électron libre pour élaborer une méthode très simple et efficace pour appréhender ces spectres d'absorption. Le modèle admet que les électrons  $\pi$  peuvent se déplacer librement le long des liaisons dans un système plan conjugué sous l'influence d'un champ dont le potentiel est considéré comme constant en première approximation. L'idée fondamentale de la méthode de Platt est la suivante: "la classification des orbitales des électrons dans un système cata-condensé est la même que celle des orbitales d'un électron libre, en mouvement dans un anneau d'une dimension et de potentiel constant le long du

périmètre". En première approximation, ce périmètre est un cercle de même longueur. Dans ce cas on est ramené au calcul des orbitales et des énergies d'un électron libre ayant une trajectoire circulaire avec un potentiel constant, système appelé rotateur plan. La résolution de l'équation de Schrödinger est très simple et conduit à des orbitales de la

$$\text{forme } \psi(\theta) = \frac{e^{iq\theta}}{\sqrt{2\pi}}$$

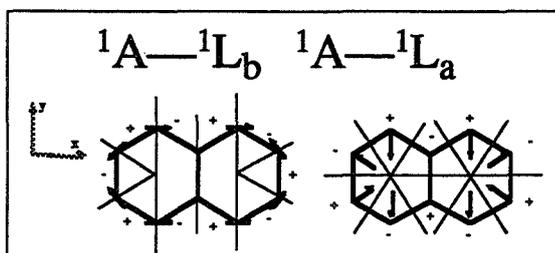
et des énergies  $E_q = q^2 \frac{h^2}{8\pi^2 I} = 1.21 \cdot 10^6 \frac{q^2}{\ell^2}$  avec  $i$  nombre imaginaire,  $\theta$  angle (paramètre

monodimensionnel pour le cercle),  $q$  un nombre quantique ( $q=0, 1, 2, \dots$ ) que Platt appelle le nombre quantique orbital,  $h$  la constante de Planck,  $I$  le moment d'inertie de l'électron ( $I=mr^2$ ,  $m$  masse de l'électron et  $r$  le rayon du cercle) et  $\ell$  la longueur du périmètre exprimée en Å et l'énergie  $E_q$  en  $\text{cm}^{-1}$  [Barriol, 1966]. Ces expressions montrent que l'on obtient deux états distincts pour  $q$  et  $-q$  correspondant à la même valeur de l'énergie (si  $q \neq 0$ ); ces valeurs de l'énergie sont dites dégénérées. On peut souligner que plus  $L$  est grand plus l'énergie est basse et plus le spectre est déplacé vers le rouge. Platt détermine le nombre de nœuds de la fonction d'onde ( $\psi(\theta)$  change de signe) sur le périmètre avec le fait que le plan nodal reste le plan de la molécule. Lors d'une transition électronique, un électron passe d'une couche complète à une couche incomplète, modifiant le nombre

$$\text{quantique total } Q = \sum_{i=1}^n q_i.$$

En notant  $n$  le nombre de noyaux ( $n$  étant aussi le nombre d'électron  $\pi$ ), Platt appelle  $L$  l'état qui correspond à une transition où  $Q=2n+1$ . Si l'on introduit les liaisons médianes (qui relient entre eux certains points du périmètre (qui correspond aux liaisons entre les positions des atomes)) et le champ de potentiel non plus constant mais périodique (dû à la présence des atomes sur le périmètre), la dégénérescence se trouve levée et Platt affecte ces états par des indices  $a$  et  $b$  [Sandorfy, 1959]. En outre ces transitions sont classées par Platt comme étant "moment-interdits" car entraînant d'importants changements des moments linéaire (quantité de mouvement  $\vec{p}$  : masse  $\times$  vitesse) ou angulaire (produit vectoriel position et moment linéaire  $\vec{r} \wedge \vec{p}$ ). Les indices  $a$  et  $b$  dénomment les polarisations  $x$  ou  $y$  de la transition dans le plan de la molécule [Platt, 1951]. Ces indices ont aussi une autre signification plus importante encore pour le diagramme de polarisation: l'indice  $a$  se réfère aux états où la ligne nodale (qui relie les nœuds) croise les liaisons médianes, l'indice  $b$  aux états où elle ne les croise pas. En outre en mettant des  $+$  et des  $-$  alternés aux ventres, on reconstitue la symétrie de la fonction d'onde et par là même la direction du moment électrique résultant. Une première approximation du moment de transition  $|R_{ij}|$  peut être obtenue en remplaçant les fonctions d'onde  $\psi_i$  et  $\psi_j$  par une densité de charge  $\rho$  qui a les mêmes propriétés de symétrie et qui représente la transition correspondante dans un système à un seul électron.

Prenons par exemple le cas des transitions de l'état de base noté  $^1A$  vers  $^1L_a$  et  $^1L_b$  du naphthalène pour éclaircir ces concepts. Les diagrammes de polarisation du naphthalène pour ces 2 transitions sont représentés ainsi:



Avec  $\sigma=5$  (5 signes + et 5 signes -), le moment de transition  $R$  est égal au diamètre du cercle divisé par  $\sigma$  et divisé par 4 (facteur de normalisation).  $R$  est exprimé en Å pour un diamètre en Å. Platt donne l'évaluation de  $f$  par:  $f=1.085 \cdot 10^{-5} \bar{\nu} G R^2$  avec  $\bar{\nu}$

en  $\text{cm}^{-1}$ ,  $G=1$  pour un état non dégénéré et 2 pour un état dégénéré et  $R$  en Å.

Par cette méthode on a accès rapidement aux symétries des fonctions d'onde, aux énergies des bandes d'absorption et à une approximation grossière du moment de transition et par là même de  $f$ . Cette méthode a été étendue aux substitutions sur les noyaux [Petruska,1961] et appliquée aux indoles [Feitelson,1965]. Pour les noyaux chromophores indole et 5-oxyindole qui nous intéressent ici, la classification de Platt issue de cette méthode pour les molécules cata-condensées, pose de nombreuses ambiguïtés [Callis,1984]. Cependant le schéma de Platt a été confirmé pour l'indole et les 5-OHs par de nombreux calculs avec différents modèles:

- modèle des orbitales localisées de Murrell [Lami,1976],
- modèle LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) avec des calculs type CNDO/s (Complete Neglect of Differential Overlap) [Callis,1984]
- modèle LCAO avec des calculs type INDO/s (Intermediate Neglect of Differential Overlap) [Eftink,1990].

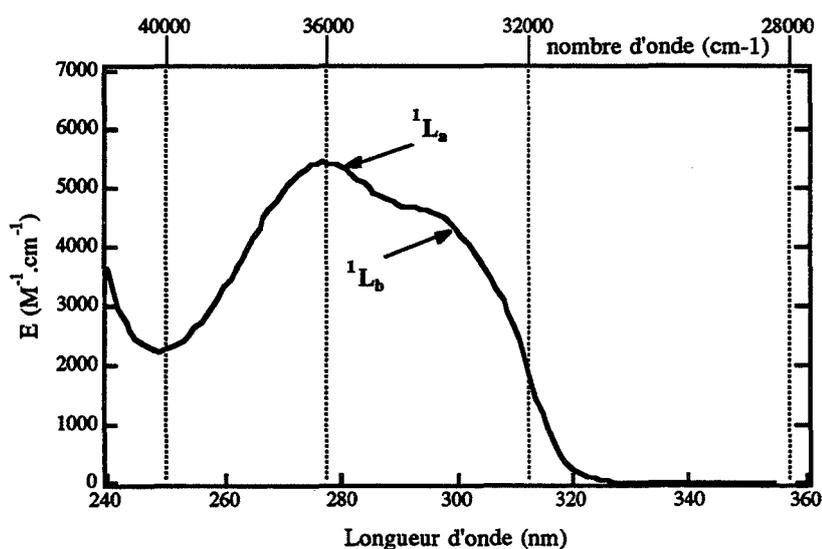


Figure II-2: Spectre d'absorption de la 5-HT

### II.B.3. Spectre d'absorption expérimental

Les premières transitions des 5-OH ont lieu dans l'UV. La figure II-2 montre les deux premières bandes d'absorption de la 5-HT dans du tampon pH7. Pour le 5-HIAA aucune différence sur ce spectre d'absorption n'a été mesurée. La première bande d'absorption de la 5-HT correspond aux transitions de l'état fondamental  $S_0$  vers l'un des deux premiers états excités  $S_1$  et  $S_2$  que l'on note habituellement, par abus de langage,  ${}^1L_a$  et  ${}^1L_b$  selon la notation de Platt [Platt,1949]. Comme pour l'indol, l'absorption des dérivés substitués de l'indol est formée de ces deux bandes qui se recouvrent partiellement.

Quelques différences au niveau des spectres UV entre les groupes moléculaires indol et 5-OH ont été trouvées essentiellement au niveau des effets de polarité du solvant [Lami,1986], [Albinsson,1992]. Dans l'eau, milieu polaire, les composés 5-OH présentent un spectre assez différent des composés indols non hydroxylés en position cinq: pour les molécules 5-OH, les deux premières bandes d'absorption correspondant, aux transitions vers les états  ${}^1L_a$  et  ${}^1L_b$ , sont mieux séparées que celles des indols simples. La bande  ${}^1L_a$  reste assez semblable entre les deux classes de molécules, par contre la bande  ${}^1L_b$  des 5-OH présente un déplacement vers le rouge ainsi qu'une chute du coefficient d'extinction moléculaire [Glasser,1979]: dans l'eau les positions de  ${}^1L_a$  pour l'indol et le 5-hydroxyindol sont identiques à 268 nm alors que pour  ${}^1L_b$  on a respectivement 285 et 305 nm, soit une différence de  $2300\text{ cm}^{-1}$ . En final, pour les 5-OH dans un milieu polaire, la transition  ${}^1L_b$  constitue la première bande d'absorption sans équivoque possible, comme cela peut se présenter pour les indols non substitués [Lami,1986], [Eftink,1990], [Albinsson,1989], [Albinsson,1992].

#### II.B.3.a. Bandes expérimentales des 5-OH

Avec le modèle de Kunh et Braun, les paramètres des deux premières transitions pour la 5-HT dans du tampon pH 7 sont calculés par une analyse non-linéaire et sans poids optimisés par la méthode des moindres carrés sur le domaine des nombres d'onde de  $28000$  à  $37000\text{ cm}^{-1}$  (Figure II-3 et Tableau II-2). Pour la bande  ${}^1L_a$  on obtient une force d'oscillateur égale à  $0.107$ . En tenant compte des erreurs standards sur les paramètres de la gaussienne,  $f_{\text{exp}}$  est comprise entre  $0.10$  et  $0.115$ . Au niveau des erreurs sur les paramètres de la gaussienne pour  ${}^1L_a$ , il faut tenir compte du fait que, pour éviter au maximum l'effet des bandes situées à des énergies supérieures, nous nous sommes restreints au domaine des nombres d'onde inférieur à  $37000\text{ cm}^{-1}$ .

Pour  ${}^1L_b$ ,  $f_{\text{exp}} = 0.028$ , avec un écart situé entre  $0.024$  et  $0.033$ .

transition	paramètre	valeur	erreur standard
$1L_a$	$\epsilon_{\max}(\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	5476	33.8
	$\bar{\nu}_{\max}(\text{cm}^{-1})$	36096	45.5
	$\lambda(\text{nm})$	277	
	$h(\text{cm}^{-1})$	2560	186.8
$1L_b$	$\epsilon_{\max}(\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	2814	309.
	$\bar{\nu}_{\max}(\text{cm}^{-1})$	33125	38.5
	$\lambda(\text{nm})$	302	
	$h(\text{cm}^{-1})$	1307	67.7

Tableau II-2:

Paramètres de la double gaussienne pour les deux premières bandes d'absorption de 5-HT dans le tampon pH7

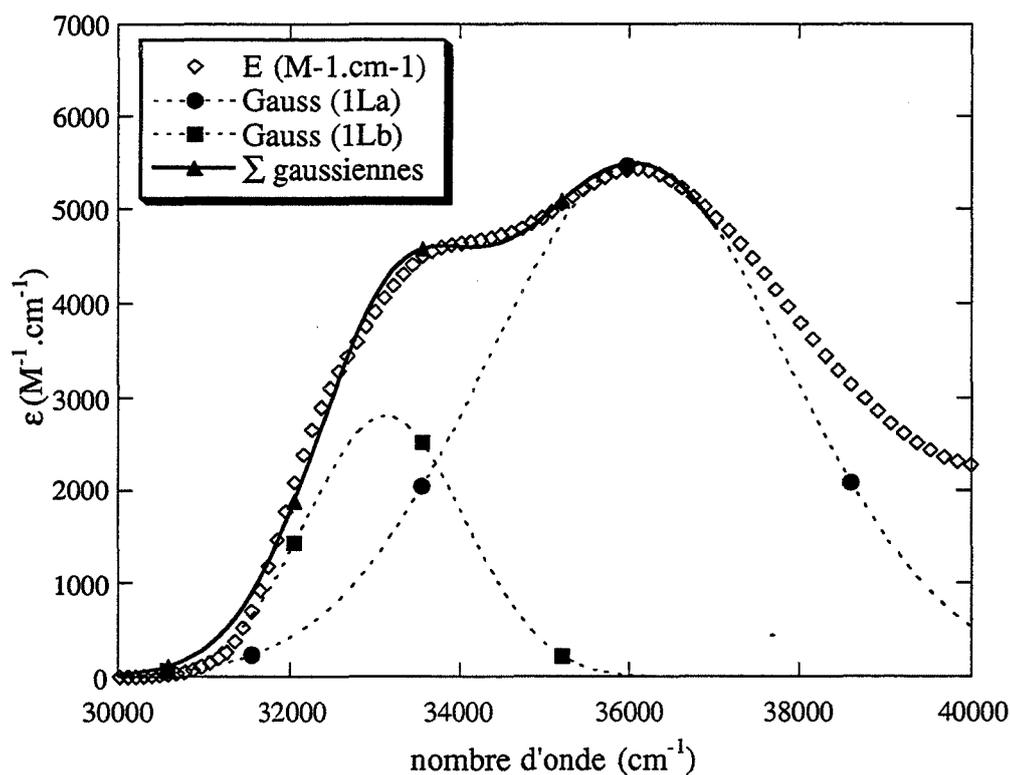


Figure II-3: Modélisation par une double gaussienne des deux premières bandes d'absorption de la 5-HT en fonction du nombre d'onde

### II.B.4. Calcul théorique du spectre électronique de 5-HT et 5-HIAA

Le but de cette démarche est de mieux comprendre les mécanismes d'absorption des molécules de 5-HT et de 5-HIAA afin d'étudier une possible variation entre ces deux molécules au niveau de la faible absorption pour la longueur d'onde du laser azote (337nm) que nous utiliserons ultérieurement. Un autre point d'intéressant réside dans l'acquisition d'une meilleure connaissance des états excités. N'ayant pas trouvé de traces bibliographiques sur le calcul du spectre électronique de la 5-HT et du 5-HIAA, nous avons entrepris de le réaliser. Cependant des travaux assez proches de ceux exposés ici ont été réalisés: le 5-hydroxyindol [*Catalan,1986*] et les différentes espèces anioniques et protonées de l'indole-3-acétique acide [*TomasVert,1991*], ont fait l'objet de calcul des spectres électroniques par les méthodes CNDO/s. Avec la méthode INDO/s, le 5-méthoxyindol a été choisi pour la classe des 5-oxyindols [*Eftink,1990*], [*Albinsson,1992*].

#### II.B.4.a. Démarche scientifique de ce calcul théorique

Pour calculer une propriété moléculaire comme le spectre électronique, deux voies s'ouvrent au départ:

- soit partir d'un modèle moléculaire,
- soit de données expérimentales apportant les distances internucléaires au sein de la molécule elle-même.

Nous utiliserons cette dernière méthode dont les données sont issues essentiellement de la cristallographie moléculaire.

Une fois les coordonnées cartésiennes extraites des données cristallographiques, il faut choisir une méthode de traitement théorique. Les méthodes de calcul ab initio (non semi-empirique) pour des molécules aussi complexes n'étant pas encore possible, nous avons mis en oeuvre deux méthodes semi-empiriques:

- CNDO CI/s (Complete Neglect of Differential Overlap, CI signifie Configuration Interaction, le /s a été ajouté à la méthode CNDO pour tenir compte des modifications des paramètres semi-empiriques quand elle est appliquée au calcul de spectre UV-vis) [*DelBene,1968*],
- INDO /s (Intermediate Neglect of Differential Overlap) [*Ridley,1973*].

L'optimisation de la géométrie des molécules n'a pas été réalisée comme prétraitement pour CNDO/s. Par contre pour INDO/s trois méthodes différentes ont été utilisées: mécanique moléculaire (MM), MOPAC (MOPAC v6.1, Molecular Orbital PACkage) [*Stewart,1989*] et Zindo (Zerner INDO). Ce qui donne trois conformères différents en fonction de la méthode d'optimisation choisie. Avec MM, l'optimisation de géométrie a été effectuée en utilisant la méthode des gradients conjugués et des critères de terminaison

fixés à 300 itérations ou une différence d'énergie de 0.001 kcal/mole entre deux conformations successives.

Les calculs par la méthode CNDO/s ont été effectués en collaboration avec l'équipe du Professeur C. Décoret du laboratoire de Chimie Théorique de l'Université Claude Bernard de Lyon que je remercie ici pour leur gentillesse et leur sympathique accueil.

La méthode INDO a été mise en oeuvre gracieusement par E. Guernier de la Société CACHE de Tektronix à partir des données que nous lui avons fournies. Je tiens à la remercier pour son aimabilité.

#### II.B.4.b. Les cristaux: sel de 5-HT et de 5-MIAA

Dès les années soixante, des calculs de chimie théorique ont été effectués sur la 5-HT avec des visées de calcul de conformation et de distance internucléaire pour mieux saisir ce que reconnaît un récepteur et par là même comprendre et prévoir pourquoi certaines molécules sont des antagonistes de la 5-HT [Kier,1968], [Chothia,1969] ou pour résoudre des problèmes d'optimisation de conformation [Kang,1971], [Caillet,1977].

Deux cristaux de sel de 5-HT ont été publiés à notre connaissance:

- le monohydrate de picrate de 5-HT [Bugg,1970], [Thewalt,1972],
- et un complexe de sulfate de créatinine et de 5-HT [Karle,1965].

Nous n'avons utilisé que le cristal de picrate de 5-HT car celui-ci présentait moins d'interactions avec l'environnement.

Les données cartésiennes sont données dans le Tableau II-3.

La première colonne (n) comporte le numéro de l'atome; dans la deuxième colonne (Z), le type d'atome est indiqué: 1 pour H, 6 pour C, 7 pour N et 8 pour O. Les trois dernières colonnes (x,y et z) sont les coordonnées en Angströms.

Pour la 5-HIAA, nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données cristallographiques. Ce qui nous a amené à reconstruire 5-HIAA et 5-HIAA<sup>-</sup> respectivement à partir du:

- sel précédent de 5-HT
- sel composé du complexe de 5-MIAA et de 5-MT [Sakaki,1976].

#### II.B.4.c. Calculs du spectre électronique de la 5-HT avec les méthodes CNDO et INDO

Je ne m'étendrai pas sur ces méthodes numériques de calcul théorique, le lecteur intéressé pouvant se reporter aux ouvrages suivants [Klopman,1977], [Rivail,1989].

##### II.B.4.c.i. Résultats théoriques

La molécule 5-HT<sup>+</sup> est composée de 26 atomes décrits au Tableau II-3.

n	Z	x	y	z
1	7	2.0181000	0.1059000	-1.4373000
2	6	0.8145000	0.4747000	-1.9570000
3	6	-0.1158000	0.6255000	-0.9641000
4	6	0.1893000	0.3282000	1.6140000
5	6	1.1210001	-0.0110000	2.5597000
6	8	0.7217000	0.0071000	3.8893001
7	6	2.4288001	-0.3709000	2.2097001
8	6	2.8302000	-0.3499000	0.8946000
9	6	1.8964000	-0.0017000	-0.0774000
10	6	0.5717000	0.3273000	0.2640000
11	6	-1.5386000	1.0625000	-1.1000000
12	6	-2.5613000	0.0125000	-0.7252000
13	7	-2.5278001	-1.1260000	-1.6794000
14	1	2.7800000	-0.0797000	-1.9805000
15	1	0.7046000	0.6387000	-2.8436000
16	1	-0.6898000	0.5628000	1.8573000
17	1	1.4266000	0.0447000	4.4464998
18	1	3.0768001	-0.5909000	2.9040000
19	1	3.7333000	-0.5771000	0.6821000
20	1	-1.7229000	1.3226000	-1.9989001
21	1	-1.7112000	1.8476000	-0.4748000
22	1	-3.5251000	0.3141000	-0.7502000
23	1	-2.3756001	-0.3353000	0.2047000
24	1	-2.8961000	-0.8948000	-2.4947000
25	1	-1.6172000	-1.4888999	-1.6867000
26	1	-3.0316999	-1.8480999	-1.3562000

Tableau II-3:

Coordonnées cartésienne de la 5-HT<sup>+</sup> (issu de [Bugg,1970], [Thewalt,1972])

Atome	nombre	OM	e <sup>-</sup> de valence
O	1	4	6
N	2	8	10
C	10	40	40
H	13	13	13
total	26	65	68

Tableau II-4:

Nombre d'orbitales moléculaires et d'électrons de valence  
à considérer pour la 5-HT<sup>+</sup>

Les 68 électrons forment 34 paires (Tableau II-4). Il reste donc 65-34 soit 31 orbitales vacantes. La HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et la LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) sont respectivement les OM numéros 34 et 35. Les premières transitions sont essentiellement dues aux transitions théoriques entre ces deux OM et leurs proches voisines. La première étape donne cent transitions théoriques (34 vers 35, 33 vers 35...). Puis par une diagonalisation de la combinaison linéaire de ces cent transitions (interaction de configurations) on obtient un certain nombre de transitions dont les énergies (exprimées par les nombres d'onde) sont les valeurs propres. La répartition par rapport aux cent transitions théoriques sont données par le module au carré des valeurs des vecteurs propres.

Les Tableaux II-5 et II-6 présentent les résultats obtenus par CNDO/s et les Tableaux II-7 et II-8 ceux issus de Zindo :

N° transition	$\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$	$\lambda$ (nm)	$f$
1	34094	293	0.027
2	39086	256	0.13
3	43692	229	0.12

**Tableau II-5:**  
Résultat du calcul des neuf premières transitions  
par CNDO/s pour la 5-HT<sup>+</sup>

nature de la transition:	HOMO-> LUMO	HOMO-1-> LUMO	HOMO-> LUMO+1	HOMO-1-> LUMO+1	HOMO-1-> LUMO+2	HOMO-2-> LUMO+1
transition <sup>1</sup> L <sub>b</sub> composée de:	23%	41%	21%	7%	4%	2.2%
transition <sup>1</sup> L <sub>a</sub> composée de:	61%	20%	10%	5%	ε%	ε%

**Tableau II-6:**  
Pourcentage de répartition des deux premières bandes  
pour la 5-HT<sup>+</sup> avec CNDO/s.

optimisation	N° transition	$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	$f$
MM	1	32210	310	0.026
	2	35588	281	0.2
	3	42094	237	0.76
MOPAC	1	31823	314	0.029
	2	36129	277	0.152
	3	41651	240	0.72
Zindo	1	32234	310	0.032
	2	36642	273	0.15
	3	42284	236	0.77

Tableau II-7:

Résultat du calcul des trois premières transitions par la méthode INDO/s pour la 5-HT<sup>+</sup> optimisée par MM, MOPAC et Zindo

nature de la transition:	HOMO->LUMO	HOMO-1->LUMO	HOMO->LUMO+1	HOMO-1->LUMO+1	HOMO-1->LUMO+2	HOMO-2->LUMO+1
transition <sup>1</sup> L <sub>b</sub> composée de:	1.7%	60%	31%	0.3%	1%	4%
transition <sup>1</sup> L <sub>a</sub> composée de:	81%	1%	1%	12%	2%	ε%

Tableau II-8:

Pourcentage de répartition des deux premières bandes pour la 5-HT<sup>+</sup> avec ZINDO/s.

#### II.B.4.c.ii. Discussion

En premier lieu le résultat à souligner est le suivant: compte tenu de l'énergie, les transitions n° 1 et n° 2 bien distinctes peuvent être attribuées respectivement à <sup>1</sup>L<sub>b</sub> et <sup>1</sup>L<sub>a</sub>.

Pour comparer avec justesse l'énergie et la force d'oscillateur calculées, il faudrait obtenir les valeurs expérimentales dans le cas où la molécule est en phase gazeuse. Cependant les prétentions de ces méthodes semi-empiriques et la détermination par la formule de Kunh et Braun des énergies de transition, visent seulement à retrouver leurs ordres de grandeur.

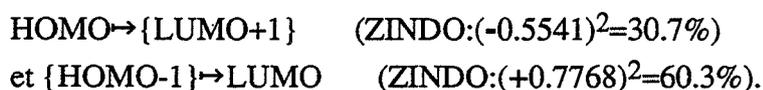
transition	calcul CNDO/s		calcul ZINDO/s		valeurs expérimentales	
	$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	$f$	$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	$f$	$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	$f$
<sup>1</sup> L <sub>b</sub>	34094	0.027	32234	0.032	33125	0.028
<sup>1</sup> L <sub>a</sub>	39086	0.13	36642	0.15	36100	0.11

Tableau II-9:

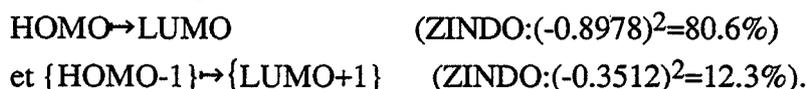
Comparaison pour les deux premières transitions de 5-HT<sup>+</sup> entre les données expérimentales et les résultats obtenus avec CNDO/s et Z\_INDO/s.

L'accord avec les données expérimentales est satisfaisant (Tableau II-9). Pour la première bande  ${}^1L_b$ , l'accord est très bon pour les deux paramètres énergie et  $f$ . L'écart entre les valeurs calculées et expérimentales sur  ${}^1L_a$  est bien plus important. L'énergie de transition calculée par CNDO/s pour  ${}^1L_a$  est anormalement trop basse pour des raisons non élucidées. Les résultats théoriques de INDO/s obtenus en utilisant différentes méthodes d'optimisation de la géométrie de 5-HT<sup>+</sup> respectent l'ordre de grandeur des énergies et de  $f$ .

Les Tableaux II-8 et II-6 montrent que les deux bandes  ${}^1L_b$  et  ${}^1L_a$  sont assez bien décrites par 4 orbitales moléculaires: les deux plus hautes occupées et les deux plus basse inoccupées. La transition vers  ${}^1L_b$  est dominée par la combinaison asymétrique des deux excitations



Pour le naphthalène et les autres molécules cata-condensées, les moments de transition pour ces deux excitations  $\text{HOMO} \rightarrow \{\text{LUMO}+1\}$  et  $\{\text{HOMO}-1\} \rightarrow \text{LUMO}$  s'annulent exactement donnant une transition vers  ${}^1L_b$  interdite. Pour le noyau chromophore indol, cette situation se reproduit en étant toutefois moins critique. A cause de cette annulation des moments de transition, les calculs de chimie quantique appliqués à la transition vers  ${}^1L_b$  sont très sensibles aux perturbations. Si, par exemple, l'intervention de l'excitation  $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$  augmente, la direction du moment de transition change fortement [Albinsson,1992]. La transition vers  ${}^1L_a$  semble moins facile à perturber. Celle-ci est composée majoritairement par la combinaison des deux excitations



Une approche physique intéressante est de s'attarder sur les représentations spatiales des fonctions d'onde  $\{\text{LUMO}-1\}$ , LUMO, HOMO, et  $\{\text{HOMO}+1\}$  calculées par ZINDO présentées sur la Figure II-4.

Néanmoins si on désire aller plus loin au niveau de la structure électronique des états excités pour mieux appréhender la fluorescence de ceux-ci, il faut s'éloigner des mathématiques et s'attarder sur la physique des résultats obtenus.

Pour l'indol, une méthode moins complexe que les calculs CNDO/INDO a été utilisée pour montrer le rôle des états de Rydberg dans le spectre électronique de celui-ci: le modèle des orbitales localisées de Murrell [Lami,1976]. Malgré les limites de cette méthode, dernièrement critiquée par Callis, spécialement pour les états  ${}^1L_a$  et  ${}^1L_b$  de l'indol [Callis,1991], cette modélisation permet de visualiser les états excités d'une molécule complexe par un ensemble d'états de fragments moléculaires et de leurs

interactions. L'indol est traité comme trois parties: benzène, éthylène et le groupe >NH. Les transitions  ${}^1L_a$  et  ${}^1L_b$  de l'indol sont alors des combinaisons linéaires des transitions suivantes:

- $\psi_\alpha$  et  $\psi_p$ , transitions entre les OM du benzène,
- $\omega$  la transition entre la HOMO et la LUMO de l'éthylène,
- $\theta_e$  la transition entre la HOMO  $2p\pi$  de >NH et la LUMO de l'éthylène,
- $\theta_b$  la transition entre la HOMO  $2p\pi$  de >NH et la LUMO du benzène,
- T la première transition entre les OM du benzène et les OM de l'éthylène composée également de la HOMO du benzène vers la LUMO de l'éthylène et de la HOMO de l'éthylène vers la LUMO du benzène,
- R la transition entre la HOMO  $2p\pi$  de >NH et la LUMO de l'orbitale de Rydberg  $3p$  de >NH,

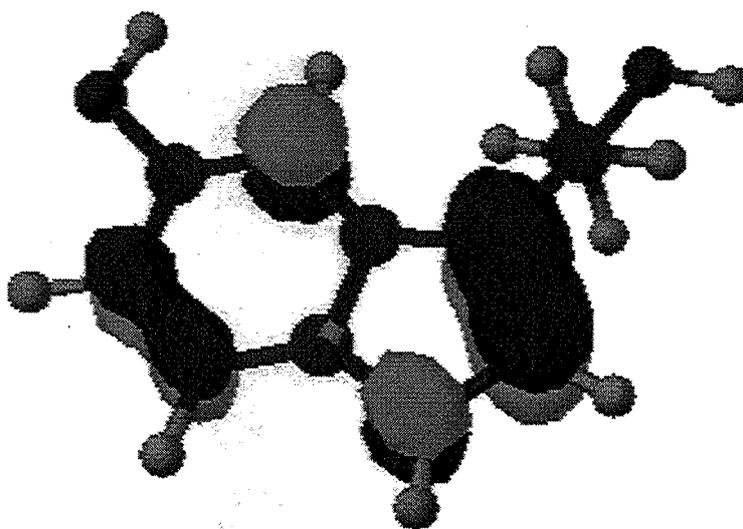
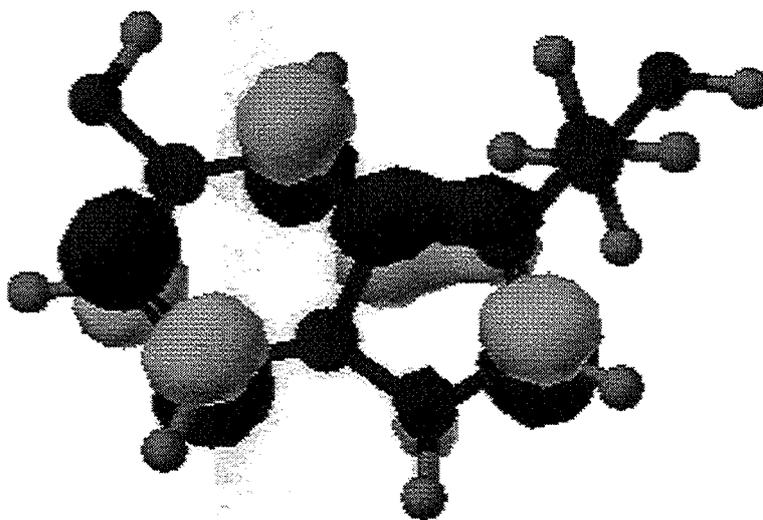
$\psi_\alpha$ ,  $\psi_p$ ,  $\omega$  et R sont localisées chacune sur un seul fragment, tandis que les trois autres représentent des transferts de charge entre une HOMO d'un fragment et la LUMO d'un autre fragment. Fondamentalement ces transferts d'énergie intramoléculaire viennent du fait que le groupe >NH a tendance à donner des électrons et que l'éthylène peut être donneur et accepteur d'électrons.

Avec le modèle développé par Lami, la nature des états excités ressort bien:

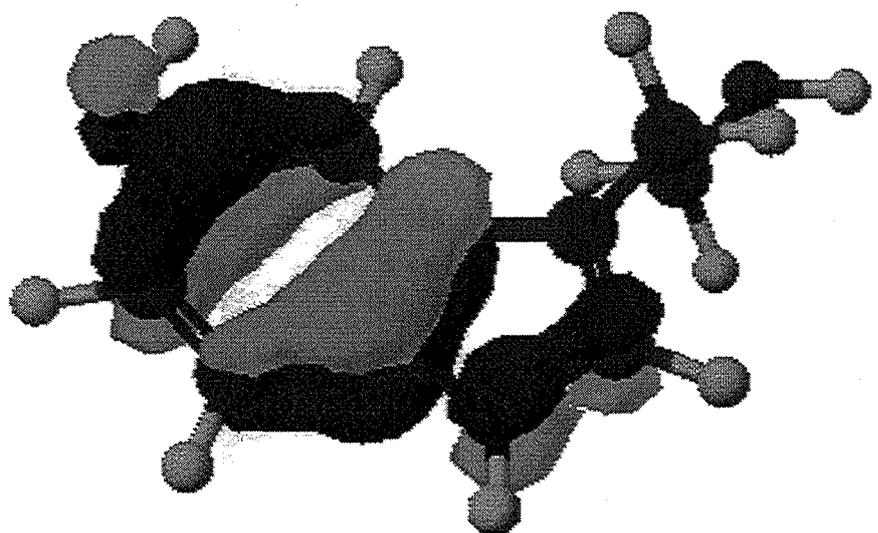
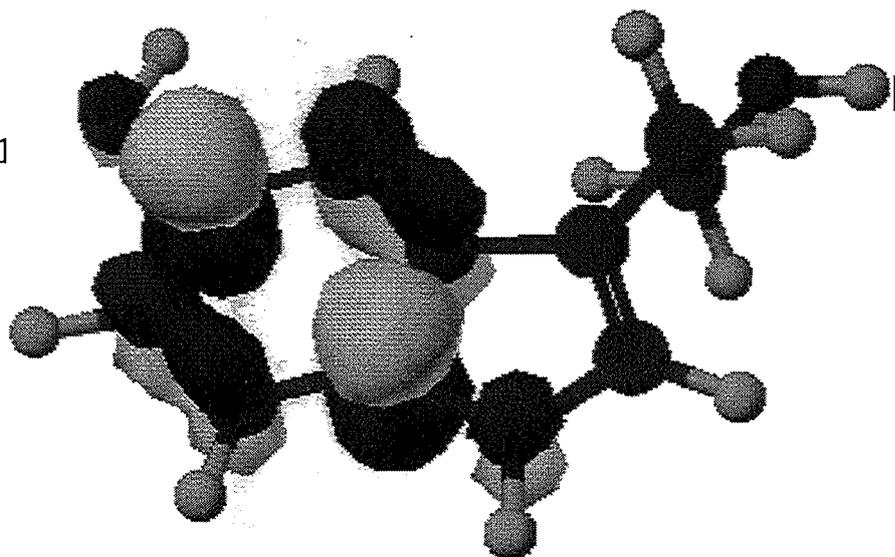
- ${}^1L_b$  est composée essentiellement de la bande  $\alpha$  du benzène (67%),
- ${}^1L_a$  a une contribution prédominante de la LUMO du fragment éthylène (57%).

Comme nous l'avons vu plus haut, l'hydroxylation en position 5 de l'indol déplace vers le rouge la bande  ${}^1L_b$  et laisse la bande  ${}^1L_a$  inchangée. Le fort pourcentage (67%) de  $\psi_\alpha$  pour  ${}^1L_b$  pourrait largement expliquer cette observation. De plus le caractère de faible  $f$  et de structure marquée pour la bande  $\alpha$  du benzène reste en concordance avec ces mêmes caractères de  ${}^1L_b$ .

Les résultats (énergies de transition et force d'oscillateur) obtenus par ce modèle simple appliqué à l'indol, sont confirmés par les calculs CNDO/s et INDO/s de Callis [Callis,1984], [Callis,1991]. Cependant les calculs de Lami ne correspondent pas aux derniers résultats expérimentaux (les polarités des deux premiers états excités sont très différents et les moments de transition sont perpendiculaires) alors que les calculs INDO/s y conduisent [Callis,1991]. L'origine de ces différences importantes est située au niveau des fonctions d'onde des deux états. Le caractère de la bande  ${}^1L_b$  du benzène est fortement conservé pour la  ${}^1L_b$  de l'indol mais les transferts de charge et l'excitation locale de l'éthylène sont beaucoup moins prononcés avec INDO/s. Avec les calculs de Lami, la force d'oscillateur de  ${}^1L_a$  provient entièrement de l'éthylène contrairement aux calculs de Callis où la moitié de l'intensité d'absorption est fournie par le caractère benzénoïde de  ${}^1L_a$ .

**LUMO****HOMO**

LUMO+1



HOMO -1

**Figure II-4:**  
Représentations spatiales des fonctions d'onde  
{LUMO-1}, LUMO, HOMO, et {HOMO+1}  
calculées par ZINDO pour 5-HT<sup>+</sup>  
(vert et bleu pour les HOMO et {HOMO+1};  
jaune et rouge pour les LUMO et {LUMO-1})

### II.B.4.d. Calculs du spectre électronique du 5-HIAA avec les méthodes CNDO et ZINDO

#### II.B.4.d.i. Résultats théoriques

En opérant de la même manière que celle exposée pour la 5-HT<sup>+</sup>, on obtient avec CNDO/s et INDO/s:

- pour le 5-HIAA<sup>-</sup> reconstruit à partir du 5-MIAA, des résultats aberrants,
- pour le 5-HIAA reconstruit à partir de la 5-HT, les valeurs suivantes pour  $^1L_b$  et  $^1L_a$ : 301nm (33211cm<sup>-1</sup>) et 272nm (36753cm<sup>-1</sup>) ainsi que 0.01 et 0.15 pour les forces d'oscillateur avec CNDO/s. Avec la méthode INDO/s, des valeurs comparables sont obtenues.

### II.B.5. Conclusion sur l'absorption de la 5-HT et du 5-HIAA

Ces résultats (énergies et  $f$  des bandes  $^1L_b$  et  $^1L_a$ ) sont à mettre en parallèle avec ceux de Catalan qui donne des résultats théoriques par CNDO/s pour le 5-hydroxyindol: des longueurs d'onde de 297 et 271 nm avec des forces d'oscillateur de 0.038 et 0.25 pour  $^1L_b$  et  $^1L_a$  respectivement [*Catalan,1986*].

Au niveau des énergies, la comparaison entre nos données et ces résultats confirme que l'effet du "bras" 2-aminoethyl de la 5-HT ne joue qu'un rôle mineur par rapport au noyau 5-hydroxyindol.

**Aucune différence significative n'apparaît au niveau du calcul théorique du spectre électronique entre la 5-HT et le 5-HIAA.**

**Il est à souligner que les calculs théoriques sont en accord avec les résultats expérimentaux en ce qui concerne les deux premières transitions qui ont fait l'objet de ce travail. Ces calculs confirment que l'on est en présence uniquement des deux bandes répertoriées  $^1L_b$  et  $^1L_a$ .**

### II.B.6. Spectre d'émission de la 5-HT

#### II.B.6.a. Introduction

Dès 1955, la fluorescence de la 5-HT (fluorescence UV) dans des solutions aqueuses a été étudiée: les pics d'excitation et d'émission sont respectivement 295 et 340 nm (non corrigés) [*Udenfriend,1955*]. Cette fluorescence UV est commune aux 5-oxyindols et aux indols simples. Dans des solutions très acides (3N HCl), sans modification du spectre d'absorption, une autre fluorescence avec un maximum d'émission vers 550nm a été observée avec une excitation vers 295nm (cette émission sera appelée fluorescence

verte) [Udenfriend,1955], [Duggan,1957]. Un tel phénomène, observé avec un décalage spectral aussi important ( $>10000 \text{ cm}^{-1}$ ) est inhabituel en fluorescence. De plus celui-ci est spécifique aux 5-oxyindols. Cette fluorescence verte a été largement utilisée à des fins analytiques dans le but de mesurer les 5-oxyindols en présence d'autres indols surtout au niveau d'extraction de tissus. Les mécanismes photophysiques générant cette fluorescence verte n'ont toujours pas été complètement élucidés malgré une importante littérature [Bridges,1968], [Chen,1968], [Wolfbeis,1985]. Les changements des fluorescences UV et verte en fonction du pH et de la température ont fait l'objet de nombreux travaux [White,1959], [Hanson,1966], [Chen,1968], [Bridges,1968], [Thompson,1969], [Macneil,1972]. En outre les temps de déclin de fluorescence pour ces deux émissions spontanées ont été étudiés pour la première fois dès la fin des années 60 [Chen,1967], [Chen,1968].

Finalement au niveau du pH physiologique 7.4, la fluorescence UV de la 5-HT n'est pas assez spécifique pour être utilisée dans le cadre de notre objectif de réalisation d'un microcapteur à fibre optique. La fluorescence verte de la 5-HT n'apparaissant que pour des pH inférieurs à 2 n'est pas utilisable pour notre application.

Dans la partie concernant l'absorption, nous avons vu que la première bande de transition électronique  ${}^1L_b$  des 5-OHs est déplacée vers le rouge par rapport aux indols simples (285nm pour l'indol et 305nm pour le 5-hydroxyindol dans l'eau). Nous avons donc cherché à exciter le 5-HT en queue d'absorption avec un rayonnement laser pour compenser la faible absorption, la gamme d'excitation allant de 315nm à 340nm. Dans cette gamme le seul laser facilement utilisable et peu onéreux est le laser azote. Le laser azote est un laser impulsionnel à gaz émettant à une seule longueur d'onde égale à 337 nm. Il a l'avantage de fonctionner facilement (mode super-radiant) et d'être d'un coût raisonnable. Par contre le faisceau est relativement divergent ce qui complique l'injection dans une fibre optique micronique. Ainsi nous avons été amené à étudier les propriétés photophysiques de la 5-HT et l'effet de la longueur d'onde d'excitation sur l'émission.

L'excitation de la 5-HT à des longueurs d'onde supérieures à 315nm conduit à une émission spontanée en bande large dans le bleu ( $\lambda_{\text{max}}$  vers 390nm avec une largeur de 80nm) qui à notre connaissance n'a jamais été reportée auparavant (appelée fluorescence bleue de la 5-HT).

Après un rappel sur l'émission des 5-OHs, l'étude spectrale par la fluorescence statique sera détaillée et enfin l'analyse des temps de déclin de cette fluorescence bleue sera abordée.

#### II.B.6.b. Rappel sur l'émission des 5-OH

Certains résultats de la littérature ([Lami,1976] et [Glasser,1979]) concernant le 5-MO et le 5-hydroxyindol en phase gazeuse ou dissous dans des solvants non polaires et

polaires, montrent que la nature de l'état émissif est uniquement  ${}^1L_b$  et cela dans tous les solvants (heptane, méthanol et eau) car le saut d'énergie entre  ${}^1L_a$  et  ${}^1L_b$  entraîne une non interaction entre ces deux niveaux pour ces molécules. Pour les autres molécules indols et ses dérivés ces deux états interagissent donnant lieu à des modifications de fluorescence anormaux (solvatochromisme, perte de structure...). Le moment de transition d'émission  $|R|$  pour la fluorescence UV de 5-MO dans l'eau reste constant en fonction de la température excluant la possibilité d'émission simultanément à partir des deux premiers niveaux [Glasser,1979]. L'analyse des constantes cinétiques ( $k_F$ ,  $k_{nr}^S$  et  $k_{cis}$ ) en fonction de la température pour une excitation à 270nm montre l'existence d'un processus très efficace de désactivation non radiative dépendant fortement de la température. Pour le 5-MO la variation de rendement quantique est importante:  $\phi(t=5^\circ C)=0.34$  et  $\phi(t=65^\circ C)=0.09$  ainsi que la chute du temps de déclin :  $\tau(t=5^\circ C)=5ns$  à  $\tau(t=65^\circ C)<1.5ns$  [Glasser,1979]. Cette voie de désactivation ne peut être atteinte qu'après relaxation du solvant et semble être liée à l'état  ${}^1L_a$ . En outre en étudiant l'influence de la longueur d'onde d'excitation (couvrant les trois premières bandes: 220 à 300nm), Glasser montre que la désactivation non radiative de l'état excité  $S_3$  (conversion interne  $S_3 \rightarrow S_1$ ) dans l'eau est liée en partie à une rupture de la liaison H sur l'atome d'azote. Les temps de déclin ont été trouvés indépendants de la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc}$ ). Par contre le rendement quantique ( $\phi$ ) chute quand  $\lambda_{exc}$  diminue. Le processus de désactivation abaissant  $\phi$  est plus rapide que la désactivation par conversion interne ( de l'ordre de  $10^{-13}s$ ).

Ainsi pour les indols (y compris pour les 5-OH dans l'eau), il existe une voie de désactivation non radiative thermosensible, situé à 0.5 eV ( $\approx 4000cm^{-1}$ ) au-dessus de l'état radiant, lié à l'état  ${}^1L_a$ , et ne pouvant pas être atteint directement à partir de l'état de Franck-Condon. L'origine de ce processus de désactivation thermosensible des indols n'est pas clairement élucidé.

Au niveau de la fluorescence résolue dans le temps pour l'émission UV, les résultats de Chen et Glasser aboutissent à **des temps de déclin de 2.7 ns pour la 5-HT à 23°C** et dans du tampon 0.01 M tris-Cl<sup>-</sup> pH 7 (valeur identique à l'indol dans les mêmes conditions) [Chen,1967] et de 3.2 ns pour le 5-MO dans l'eau à 35 °C [Glasser,1979]. Le temps de déclin de la fluorescence verte de la 5-HT dans 3 M HCl est de 5.7 ns. Les rendements quantiques sont de 0.25 et 0.048 à 23 °C pour les fluorescences UV et verte respectivement [Chen,1968].

Les complexes (encore appelés exciplexes) eau-5methoxyindol\*, eau-5methoxytryptophane\* et eau-tryptophane\* se formant sur les deux sites Azote du pyrrole et Carbone 3 (non possible sur C 3 pour les 5-oxyindols) ont été étudiés [Hershberger,1981], [GudginTempleton,1983] et [Arnold,1992]. Ces études concluent que l'eau agit essentiellement comme un donneur protonique vis-à-vis du nuage  $\pi$  du pyrrole. La liaison eau-"nuage  $\pi$ " serait assez puissante pour permettre une émission de

caractère  ${}^1L_a$ , même dans le cas des 5-oxyindols où le saut  ${}^1L_b \rightarrow {}^1L_a$  est de l'ordre de  $1000\text{ cm}^{-1}$ . De plus les groupes acétyls ou amine du bras sur C 3 interviendraient comme un agent de positionnement stérique permettant d'avoir un conformère pour lequel le complexe eau-noyau indolique sur le  $\pi$  du pyrrole est favorisé.

#### II.B.6.c. Fluorescence statique de la 5-HT

Nous rapportons ici les spectres d'émission avec des longueurs d'onde d'excitation de 300 nm à 340 nm s'échelonnant par incrément de 5nm, de la 5-HT dans le tampon pH 7: Figure II-5. La fluorescence bleue de la 5-HT est assez faible du fait de la faible absorption.

Au niveau expérimental, la seule émission mesurée du milieu tampon vient de la diffusion Raman de l'eau. Cet effet donne une émission avec un décalage entre le nombre d'onde d'excitation ( $\bar{\nu}_{exc}$ ) et le maximum de la bande Raman de l'eau. Ce décalage est de  $3425\text{ cm}^{-1}$  et la largeur à 10% de la bande Raman de l'eau est de  $400\text{ cm}^{-1}$  [DArrigo,1981] [Glushkov,1986] et [Walfaren,1986]. Il faut soustraire les spectres d'émission du tampon seul avec ceux de la 5-HT dans ce même tampon (Figure II-6). Cette Figure donne les deux fluorescences UV et bleue de la 5-HT avec l'abscisse en nm. De plus nous avons vérifié que le tampon n'interagissait pas avec les fluorescences mesurées en utilisant de l'eau milliQ désionisée et déminéralisée. Aucun changement notable n'a pu être enregistré.

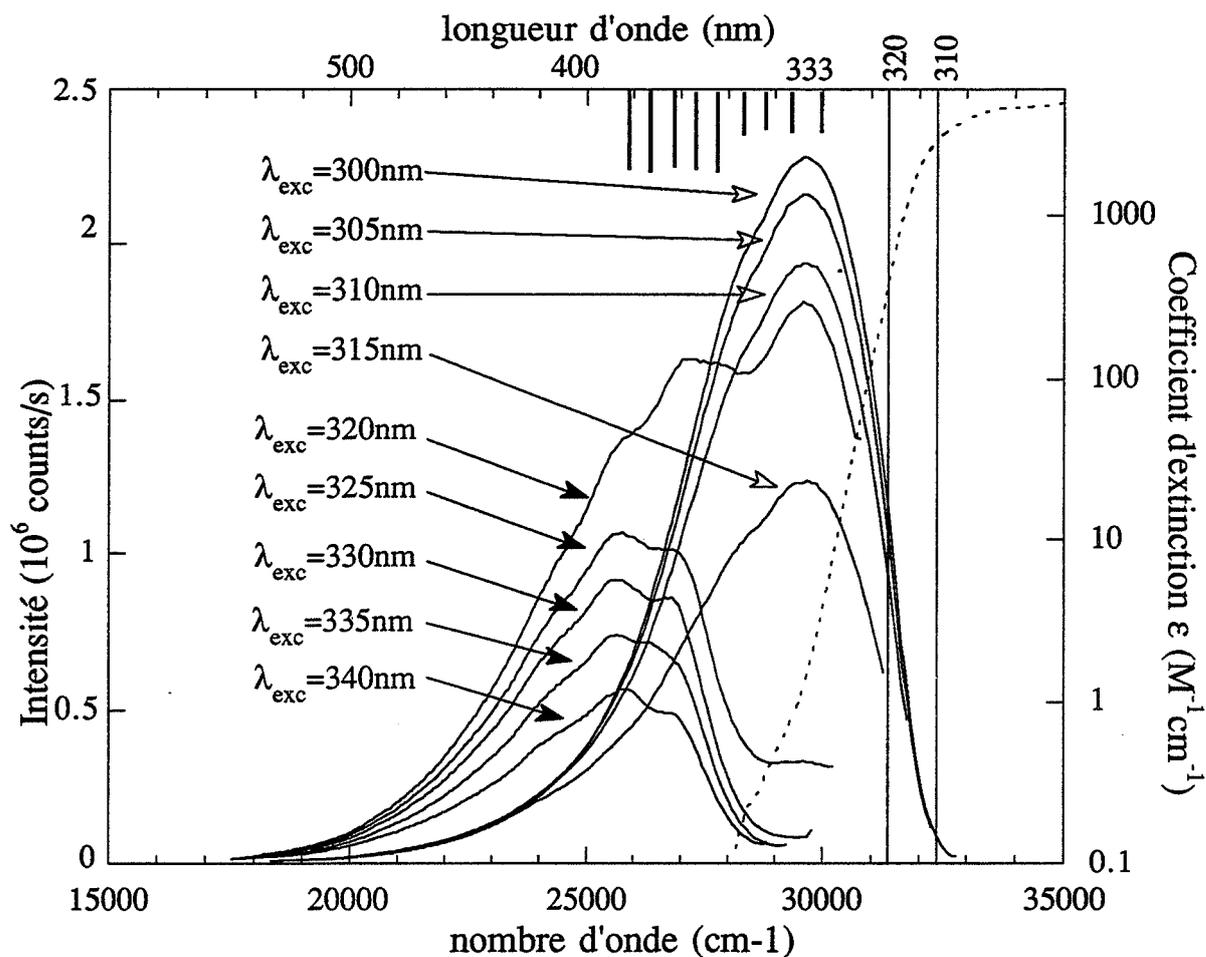


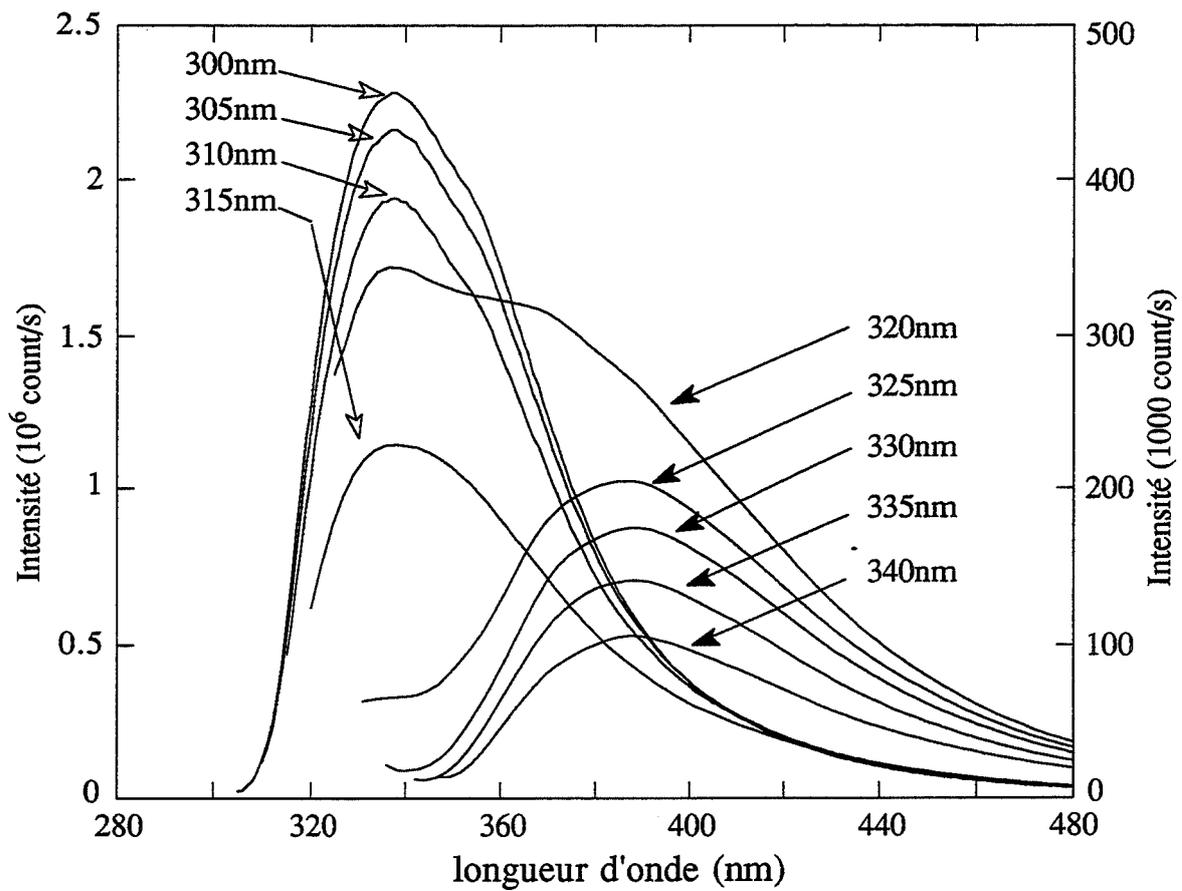
Figure II-5:

Spectres d'émission de la 5-HT (66.6 μM) dans le tampon pH 7 sans soustraction de la fluorescence du tampon ( $\lambda_{exc}$  est la longueur d'onde d'excitation).

Les spectres repérés par les flèches noires ont été multipliés par 5.

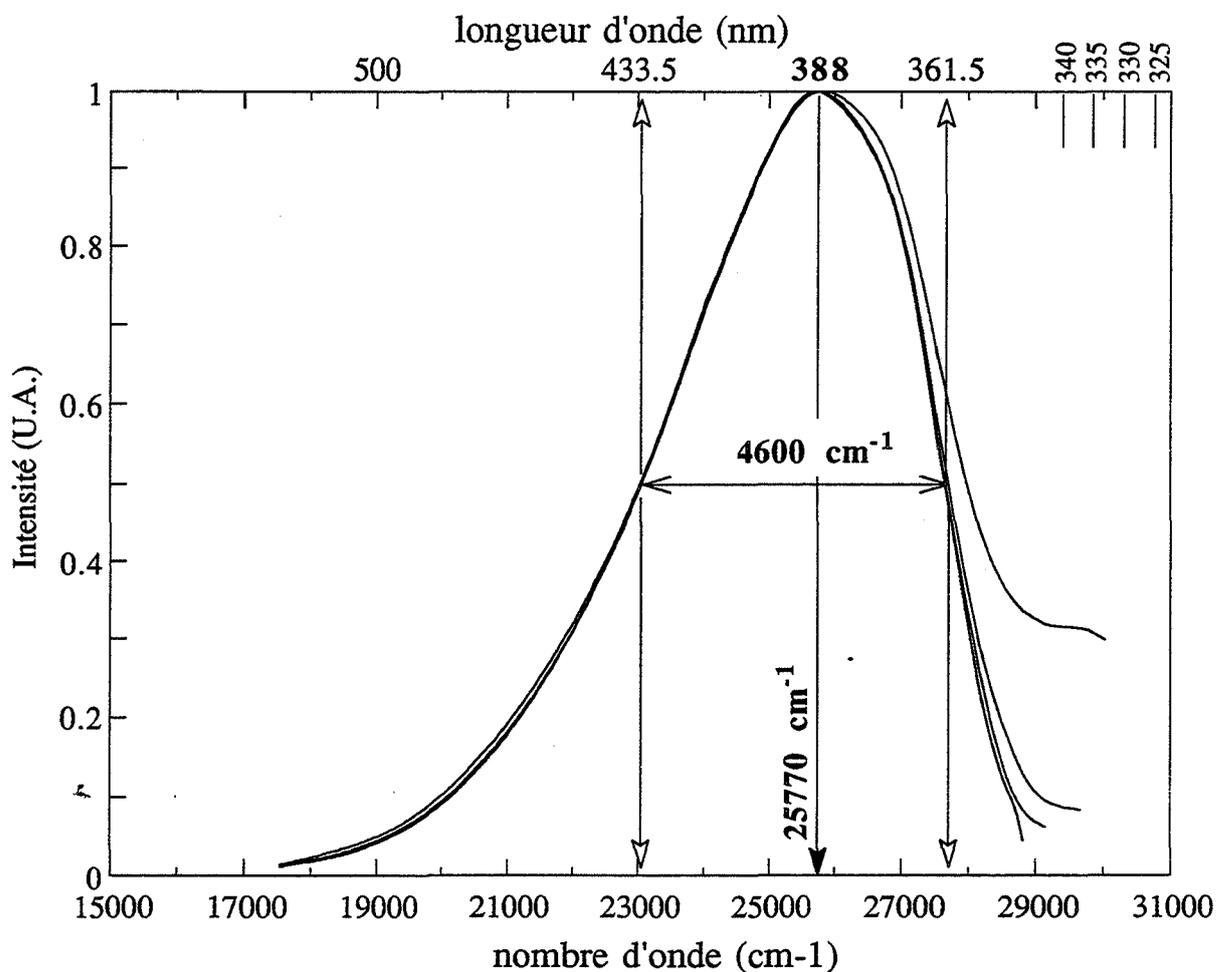
La courbe en pointillée donne le spectre d'absorption.

Les bâtons noirs donnent la position et la largeur de la bande Raman de l'eau pour chacun des 9  $\lambda_{exc}$  considérés par ordre croissant.

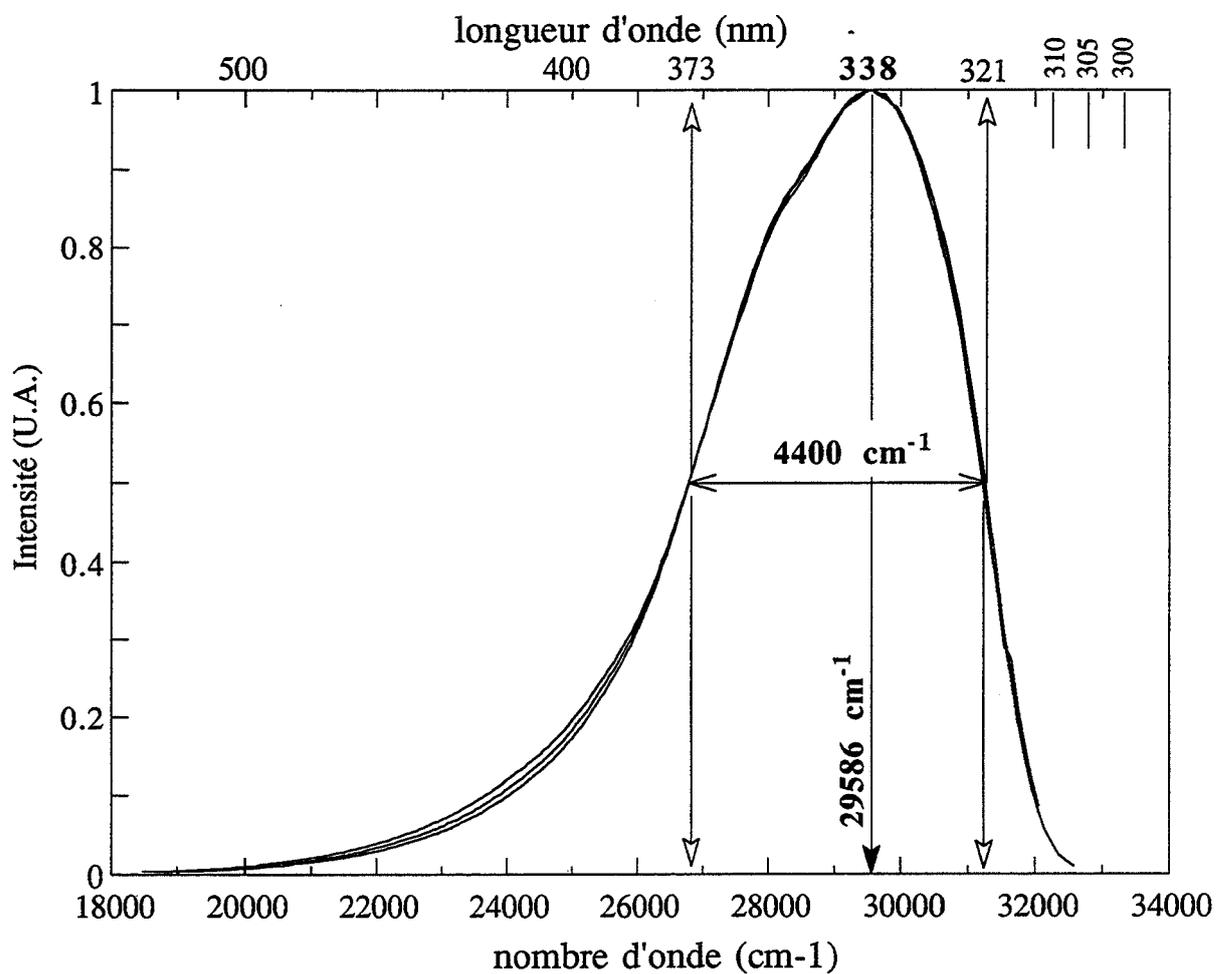


**Figure II-6:**  
Spectres d'émission de la 5-HT (66.6 $\mu$ M) dans le tampon pH7  
soustraits de la fluorescence du tampon  
( $\lambda_{exc}$  est la longueur d'onde d'excitation).  
Les spectres repérés par les flèches noires ( $\lambda_{exc}$  de 320 nm à 340 nm)  
ont leur ordonnée à droite.

Le maximum du pic de la fluorescence bleue de la 5-HT est situé à 388nm ( $25770\text{cm}^{-1}$ ). La largeur à mi-hauteur est de  $4600\text{cm}^{-1}$ , comprise entre 433.5 et 361.5nm comme indiqué sur la Figure II-7. L'écart entre les deux bandes d'émission est de  $3900\text{cm}^{-1}$  (Figure II-8).



**Figure II-7:**  
Fluorescence Bleue normalisée de la 5-HT dans le tampon pH 7  
(les longueurs d'onde d'excitation sont 325, 330, 335 et 340 nm).

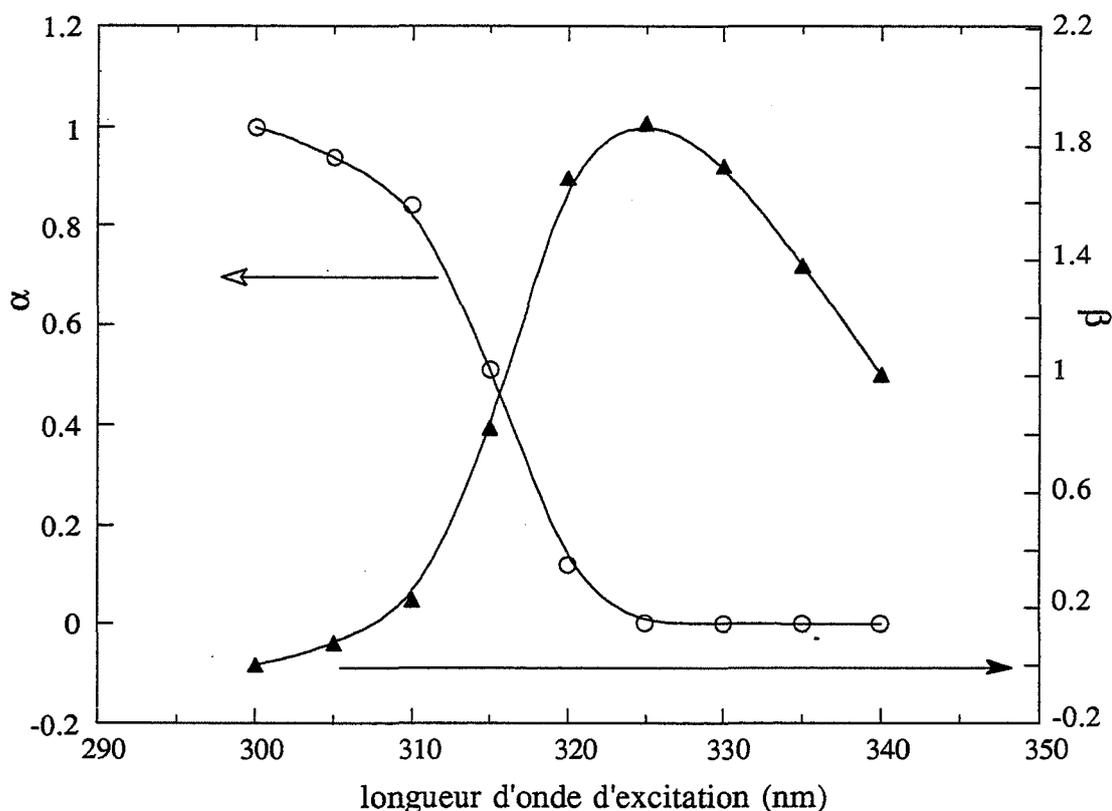


**Figure II-8:**  
Fluorescence UV normalisée de 5-HT dans le tampon pH7  
(les longueurs d'onde d'excitation sont 300, 305 et 310nm).

Les deux bandes de fluorescence se chevauchant, il nous a semblé intéressant de quantifier l'effet de la longueur d'onde d'excitation. Les spectres d'émission avec  $\lambda_{exc}=300$  et  $340$  nm sont pris comme spectres de base. Les spectres d'émission aux autres  $\lambda_{exc}$  sont approximés par un ajustement avec la méthode des moindres carrés. Deux paramètres adimensionnels  $\alpha$  et  $\beta$  sont définis pour cette identification:

$$\text{spectre}(\lambda_{exc}) = \alpha \text{ spectre}(\lambda_{exc}=300\text{nm}) + \beta \text{ spectre}(\lambda_{exc}=340\text{nm}).$$

Cette identification sera plus précise avec la fluorescence résolue dans le temps comme nous le préciserons plus loin. Cependant le maximum apparent de la fluorescence bleue semble être consécutif à une excitation à  $325\text{nm}$ .



**Figure II-9:**

Les courbes marquées par  $\circ$  et  $\blacktriangle$  représentent respectivement les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

Quand le domaine d'excitation est inférieur à  $320\text{nm}$ , les spectres d'émission de 5-HT correspondent à la fluorescence UV bien connue depuis 1955 comme nous l'avons souligné auparavant. Pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à  $320\text{nm}$  la fluorescence bleue apparaît et devient prédominante. La tryptamine a été choisie pour étudier si un phénomène semblable pouvait être observé pour les indols non substitués. Même à des concentrations élevées ( $10\text{mM}$ ) seule la fluorescence UV classique des indols a été observée. Par contre le 5-HIAA présente les mêmes propriétés que la 5-HT avec

cependant une intensité d'émission bien plus faible, dix fois moindre, à concentration équivalente.

#### II.B.6.d. Fluorescence résolue en temps (FRT) de la 5-HT par TCSPC

Afin de mieux comprendre le comportement photophysique de la 5-HT concernant les deux émissions UV et Bleue à température ambiante, nous avons étudié la FRT de la 5-HT à différentes excitations (de 285 à 335 nm). La longueur d'onde d'émission de 415 nm a été choisie comme compromis entre le maximum de la fluorescence Bleue et un éloignement vis à vis de la bande Raman de l'eau suffisant pour ne pas être gêné (pour 335 nm à l'excitation, le maximum de la bande Raman se situe à 379 nm). Pour ne pas avoir des temps de comptage trop importants nous avons travaillé avec une concentration de 500  $\mu\text{M}$  en nous assurant auparavant de l'absence d'inhibition de fluorescence par effet de concentration. Le maximum de densité optique est de 1.4 correspondant aux  $\lambda_{\text{exc}}$  du domaine 285 à 300 nm. Le minimum de densité optique pour ces mesures ( $<10^{-2}$ ), se trouvant à 335 nm, permet des temps de comptage limités à quelques heures. La Figure II-10 présente les résultats bruts obtenus. Il est clair que les temps de déclin apparents diminuent quand  $\lambda_{\text{exc}}$  augmente. Le modèle biexponentiel semble le plus approprié au vu des meilleurs  $\chi^2$  obtenus. Le Tableau II-10 et la Figure II-11 donnent l'essentiel des résultats obtenus avec ce modèle. Les  $\alpha_i$  sont les facteurs de poids préexponentiels exprimés en %. Les  $t_i$  sont les temps de déclin en ns. Les  $\Delta t$  sont les erreurs sur  $t_i$  déterminées par le logiciel.  $\chi^2$  est le "Chi-square" réduit. DW est le paramètre de Durbin Watson.  $f_i$  est la contribution de chaque composante à l'émission totale [Carraway,1991]:

$$f_i = \frac{\alpha_i t_i}{\sum_i \alpha_i t_i}$$

Les  $\chi^2$  et les DW sont satisfaisants (sauf pour  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{nm}$  pour une raison non déterminée). En dessous de 295nm, la composante rapide est trop réduite aboutissant à une diminution de la précision sur ce temps court et sur  $f_1$ . Au dessus de 320nm, la composante lente devient plus faible ce qui entraîne une erreur plus large sur les temps calculés. Ces temps de déclin longs combinés à un facteur préexponentiel de poids inférieur à 5% entraîne des contributions de l'ordre de 20%.

La première composante a un temps de déclin de 1ns alors que la seconde se révèle être plus longue : 2.7ns. Ce temps de déclin est en accord avec celui mesuré par Chen pour la fluorescence UV de la 5-HT [Chen,1967].

**En conclusion de ces expériences, il apparaît clairement que deux états émetteurs existent pour la 5-HT.**

$\lambda_{exc}$ (nm)	$\alpha_1$ (%)	$t_1$ (ns)	$\Delta t$	$\alpha_2$ (%)	$t_2$ (ns)	$\Delta t$	$\chi^2$	DW	$f_1$	$f_2$
285	18.9	0.55	0.02	81.1	2.8	0.01	1.20	1.54	4.4	95.6
295	18.8	0.87	0.02	81.2	2.6	0.05	1.14	1.85	7.2	92.8
300	24.0	0.96	0.03	76.0	2.8	0.01	1.27	1.61	9.7	90.3
305	31.6	0.85	0.07	68.4	2.6	0.04	1.11	1.79	13.1	86.9
310	47.8	0.85	0.01	52.2	2.8	0.02	1.51	1.36	21.6	78.4
315	75.2	1.00	0.03	24.8	3.2	0.10	1.11	1.73	48.8	51.2
320	79.3	0.84	0.02	20.7	1.8	0.09	1.23	1.82	64.0	36.0
325	98.5	0.99	0.01	1.5	13.3	6.8	1.12	1.90	83.0	17.0
335	96.0	1.00	0.01	4.0	6.5	1.4	1.09	1.90	79.4	20.6

Tableau II-10:

Analyse biexponentielle de la FRT de la 5-HT  
pour différentes longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc}$ ).

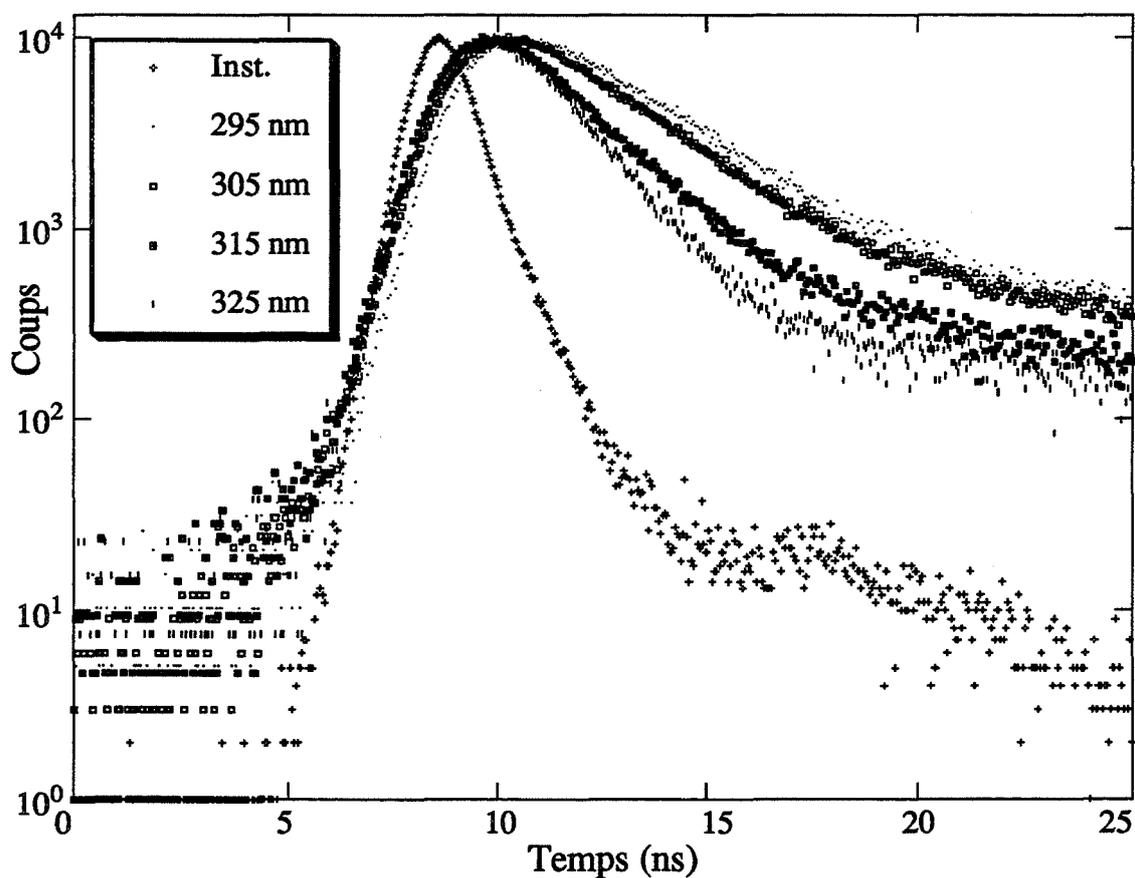
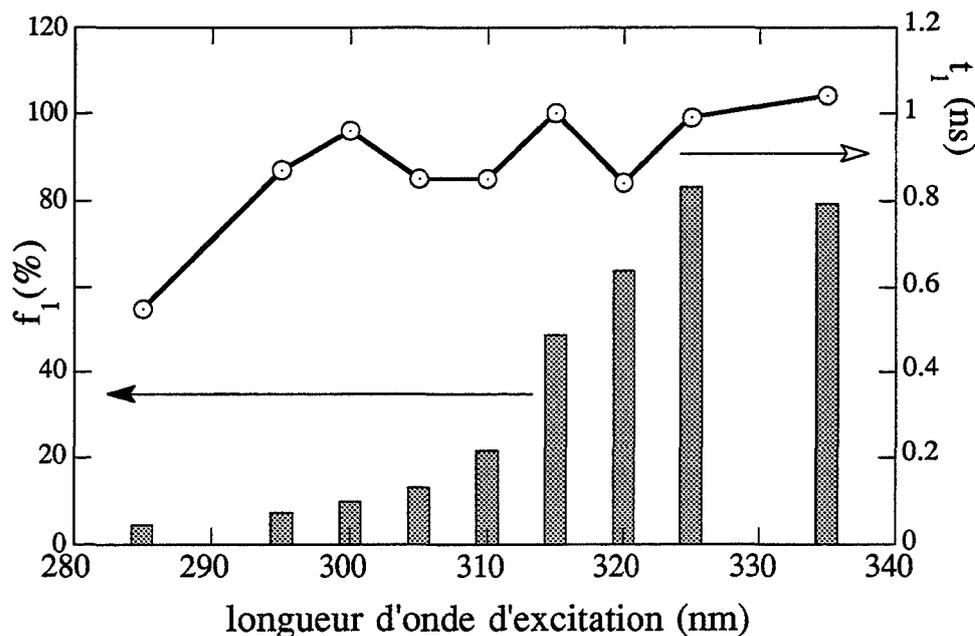


Figure II-10:

FRT de la 5-HT dans le tampon pH7 à Température ordinaire

Les courbes marquées par  $\cdot$ ,  $\square$ ,  $\blacksquare$  et  $\blacktriangle$  représentent la FRT associée respectivement aux excitations à 295, 305, 315 et 325nm. La FRT marquée par  $+$  représente la fonction instrumentale.



**Figure II-11:** Contribution de la première composante à l'émission totale ( $f_1$ ) et temps de déclin  $t_1$  en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

### II.B.7. Conclusion sur la fluorescence de la 5-HT

Sous une excitation à 295nm, le niveau de 19% pour  $f_1$  est inattendu. L'étude spectrale en illumination continue ne permettait pas d'apprécier l'importance de cette contribution de la composante rapide à cause de la combinaison du recouvrement spectral et de la plus forte intensité de la deuxième composante. Il apparaît que la fluorescence UV contient donc déjà un peu de fluorescence bleue de la 5-HT sous excitation à 295nm.

A 315nm les deux contributions  $f_1$  et  $f_2$  sont équivalentes confortant les résultats obtenus en fluorescence statique où  $\alpha=0.5$  (Figure II-9). Il faut remarquer l'augmentation importante de  $f_1$  consécutive à l'accroissement de  $\lambda_{exc}$  dans la zone 300-320nm là où est située la chute de l'absorption.

De plus il est intéressant de comparer ces résultats biexponentiels et spectraux avec ceux de Gudgin-Templeton [GudginTempleton,1983]. Cette étude de la FRT du 5-méthoxytryptophane en fonction du pH à 20°C donne deux temps de déclin  $1.3\pm 0.2$ ns et 3.9ns pour des  $pH < pK_a$  de l'amine ( $pK_a=9.39$  pour l'amine terminale du tryptophane). De plus la contribution de la composante rapide augmente avec le pH ( $\lambda_{exc}=280$  nm et  $\lambda_{em}=334$  nm). Cette composante représente 6% et 11% pour les pH respectifs de 7 et 8 (Tampon phosphate  $10^{-3}$  M). Leur conclusion s'oriente vers des phénomènes intramoléculaires accompagnés de formation d'exciplexes avec le solvant. Le fait majeur et surprenant de cette étude est, que malgré le bras éthyl reliant le C 3 du noyau chromophore de l'azote de l'amine terminale, l'état ionique de l'amine modifie les états émetteurs. Ces interactions intramoléculaires entre l'amine et le noyau chromophore à

l'état excité, avec ou sans effet de solvant, est un élément qui rend la photophysique des corps étudiés (5-HT) encore plus complexe.

La compréhension du basculement des deux émissions (bleue avec un temps de déclin de 1ns et UV avec 2.7 ns) en fonction de la longueur d'onde d'excitation à 20°C et dans le tampon pH7 nécessite d'autres études photophysiques (effet du pH, effet de la température, étude des rendements quantiques...). Ce qu'il faut retenir pour notre objectif de réalisation d'un capteur à fibre optique de mesure sélectif de 5-HT est l'existence d'une fluorescence (dite fluorescence bleue) qui n'apparaît pas pour des excitations supérieures à 320nm pour les indols non hydroxylés en position 5. En plus la fluorescence bleue de 5-HT est dix fois plus importante par rapport au 5-HIAA.

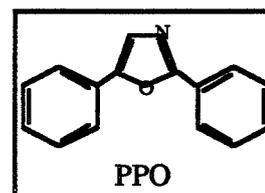
## II.C. Capteur chimique à fibre optique par FRT

Avant de présenter les résultats obtenus avec le FOCS pour la 5-HT et le 5-HIAA, nous exposerons les données expérimentales sans fibre optique d'un standard, le PPO (2,5-diphenyloxazole), ainsi que des 5-HT et 5-HIAA obtenus avec notre appareil.

Au vu des propriétés photophysiques de la 5-HT exposées ci-dessus, la longueur d'onde d'excitation optimale pour la réalisation d'un capteur à visée *in vivo* de mesure sélective de 5-HT serait 320nm. Cependant pour des raisons de mise en oeuvre et de coût, nous avons opté pour un laser Azote émettant à 337nm. Avec le dispositif décrit précédemment nous avons utilisé la FRT de la fluorescence bleue de la 5-HT comme signal donnant la concentration de 5-HT.

### II.C.1. Mesure en cuvette sans FO d'un standard

Le PPO est un corps fluorescent utilisé comme scintillateur. Son rendement quantique est élevé et quasiment égal à 1. Il est utilisé comme standard en FRT dans la gamme une à deux nanosecondes [Lampert,1983]. Dans le cyclohexane, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission au maximum sont respectivement 305nm ( $\epsilon_{305}=30\ 000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) et 360nm [Berlman,1971]. Il présente un déclin mono-exponentiel indépendant de la longueur d'onde d'émission (gamme 340 à 470nm), de 1.42ns et 1.28ns respectivement dans le cyclohexane dégazé et non dégazé sous une excitation à 300nm [Lampert,1983]. Cette différence provient de l'inhibition dynamique de fluorescence causée par l'oxygène dissous [Berlman,1971]:  $\frac{\text{intensité sans O}_2}{\text{intensité avec O}_2} = 1.1$ . La différence entre ces temps de déclin (1.42ns et 1.28ns) permet de connaître la sensibilité et la précision de la mesure en temps de déclin pour un appareillage de FRT. Le dégazage est en fait réalisé par barbotage pendant 20 minutes d'azote de qualité technique.



#### II.C.1.a. Données expérimentales brutes

La Figure II-12 donne les signaux bruts de la FRT du PPO (concentration égal à 4 $\mu\text{M}$ ) dans du cyclohexane excité à 337nm ( $\epsilon_{337}\approx 7\ 500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La longueur d'onde d'émission est 440nm avec une largeur spectrale de 4nm. Cinq FRT consécutives dans une solution dégazée et non-dégazée de cyclohexane y sont indiquées. Pour chaque courbe la FRF est une moyenne sur 256 impulsions laser.

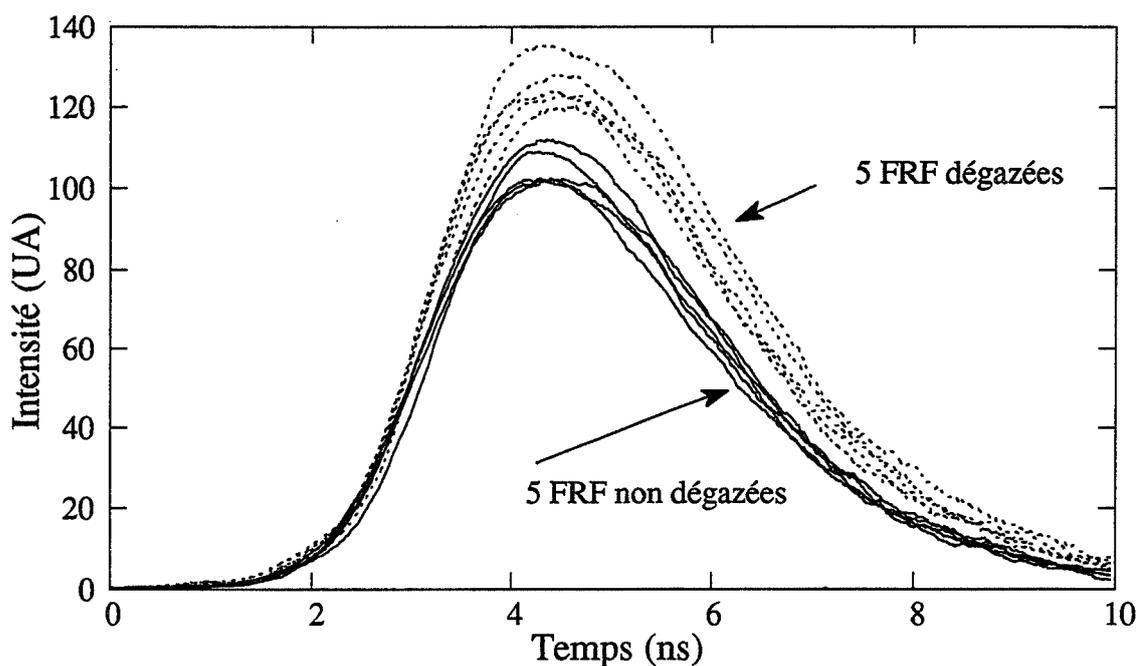


Figure II-12:

Signaux expérimentaux de FRT du PPO ( $C = 4 \cdot 10^{-6} \text{M}^{-1}$ ) dans du cyclohexane sans FO ( $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{nm}$  avec  $\Delta\lambda = 4 \text{nm}$ ).

### II.C.1.b. Intensité intégrée

Les intensités intégrées moyennes des signaux de la Figure II-12 sont rapportées sur le Tableau II-11. Le niveau du bruit a été mesuré avec une solution de cyclohexane sans PPO dans les mêmes conditions. Le nombre de SPE accumulé est calculé en prenant la valeur de l'intensité intégrée égale à 114.8 pour un seul SPE comme nous l'avons vu au chapitre précédent dans la partie "digitaliseur". Le nombre de coups laser est de 256 à 15 Hz. Le temps d'accumulation est donc de 17 secondes pour chaque courbe.

Avec les valeurs moyennes de l'intensité intégrée soustraite du bruit, le rapport  $R = \frac{\text{intensité sans } O_2}{\text{intensité avec } O_2}$  est égal à 1.29 ce qui est supérieur à la valeur attendue de 1.1.

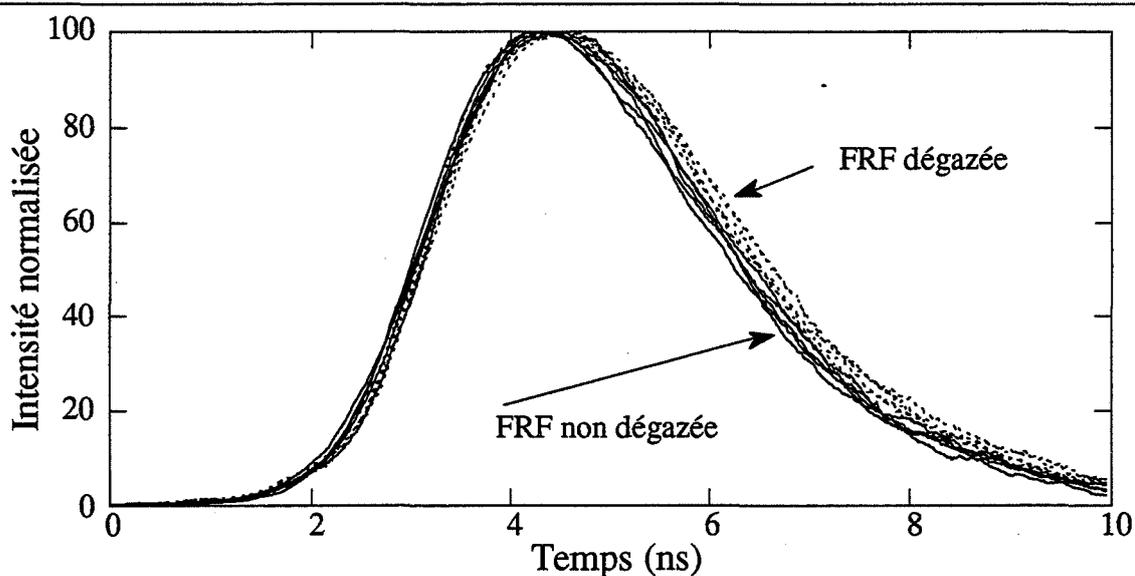
Pour obtenir des résultats plus précis il faudrait sans doute augmenter le nombre de SPE accumulé. Mais l'importance de cet écart (17%) n'est pas uniquement lié à la précision statistique de la mesure. Les 20 minutes de bullage d'azote ont entraîné une évaporation du cyclohexane et par là même une augmentation de la concentration du PPO. Cette hausse entraîne un accroissement du signal et contribue à un rapport R plus élevé.

catégorie	$I_f$ moyenne (UA)	SD	SPE moyen	nombre de SPE total
bruit (C=0)	45	2	0.39	500
PPO non dégazé	384	13.7	3.34	4250
PPO dégazé	481	13.2	4.2	5350

**Tableau II-11:**  
Intensité intégrée ( $I_f$ ) moyenne et SD (Standard Deviation) de la FRT du PPO dans du cyclohexane en cuvette sans fibre optique (Figure II-12).

### II.C.1.c. Données temporelles

Avant d'identifier les temps de déclin par convolution itérative et minimisation par les moindres carrés, nous présentons sur la Figure II-13 l'intensité normalisée des signaux FRT du PPO de la Figure II-12. Les signaux ont juste été normalisés c'est-à-dire qu'aucun décalage temporel, ni lissage n'ont été opérés. Les impulsions de fluorescence sont légèrement décalées vers les temps les plus longs et présentent une largeur à mi-hauteur plus grande. Ainsi les FRF de la solution de PPO dégazée montrent un temps de déclin plus élevé.



**Figure II-13: Comparaison des FRF du PPO.**

Sur les Figures II-14 et II-15, nous avons rapporté les résultats du traitement itératif de reconvolution et d'ajustement par les moindres carrés des FRF du PPO. La même IRF a été utilisée pour les identifications paramétriques du temps de déclin du PPO dans du cyclohexane non dégazé et dégazé. Les FRF du PPO en solution non dégazée et dégazée, l'IRF et les fonctions de convolution de l'IRF avec une monoexponentielle égales à 1.25ns et 1.40ns apparaissent respectivement sur la Figure II-14 et la Figure II-15. Les

valeurs trouvées restent comparables aux standards de 1.28 et 1.42ns. En outre il faut ici souligner l'importance du facteur correctif du décalage chromatique entre l'IRF enregistrées à 337nm et les FRF mesurées à 440nm. Le Tableau II-12 donne ces temps de déclin identifiés autour du minimum du  $\chi^2$ .

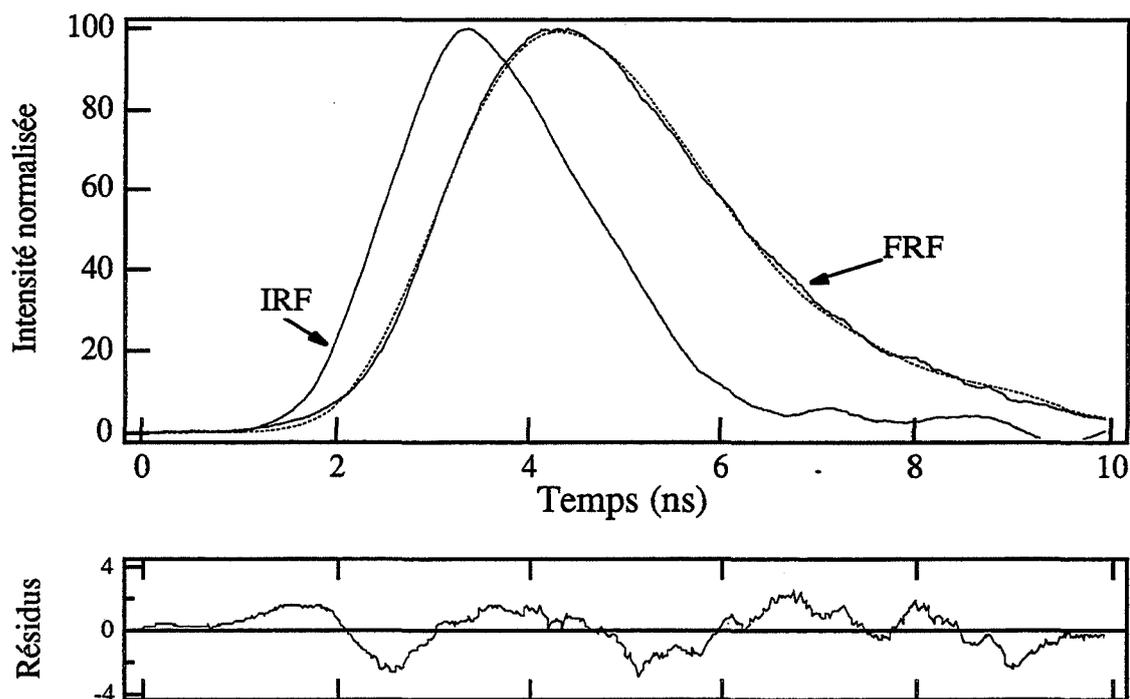
Les valeurs des temps de déclin de fluorescence du PPO obtenus sont très satisfaisants. Par contre la distribution des résidus (FRF-convolution) l'est beaucoup moins. Le faible nombre de SPE accumulé (de l'ordre de  $10^3$ ) en comparaison avec les données expérimentales classiques des systèmes TCSPC (nombre de SPE de l'ordre de  $10^6$ ) intervient sur la forme et la distribution des résidus. Néanmoins ces résidus restent compris entre des bornes raisonnables (-3 et 3) au regard du maximum fixé à 100 de la FRF.

**En conclusion l'appareil développé permet de mesurer des temps de fluorescence dans la gamme de la nanoseconde avec une précision satisfaisante pour un nombre de SPE de l'ordre de 1000 accumulé sur 17 secondes.**

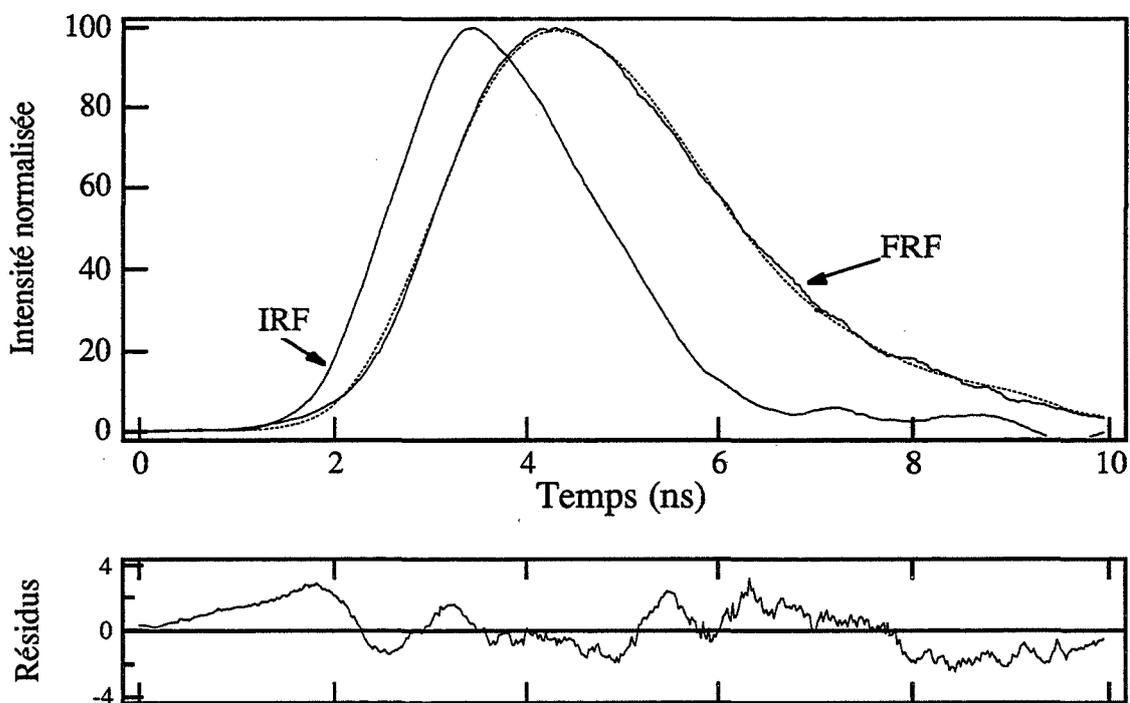
FRF du PPO en solution	n <sup>br</sup> de point de décalage	$\tau$ (ns)	$\chi^2$ sans poids
non dégazée	2	1.37	1937
	5	1.30	870
	6	1.27	713
	7	<b>1.24</b>	<b>656</b>
	8	1.22	699
	9	1.19	842
dégazée	11	1.15	1425
	8	1.47	1418
	9	1.44	1141
	10	1.42	966
	<b>11</b>	<b>1.40</b>	<b>893</b>
	12	1.37	925

**Tableau II-12:**

Valeurs de  $\tau$  et de  $\chi^2$  pour la FRF du PPO en solution non dégazée et dégazée en fonction du paramètre de correction chromatique (ce paramètre est le nombre de point de décalage (incrément de 19.53ps)).

**Figure II-14:**

Comparaison de la FRF du PPO en solution non dégazée et de la convolution IRF-  
{monoexponentielle de 1.25ns} (en pointillée).

**Figure II-15:**

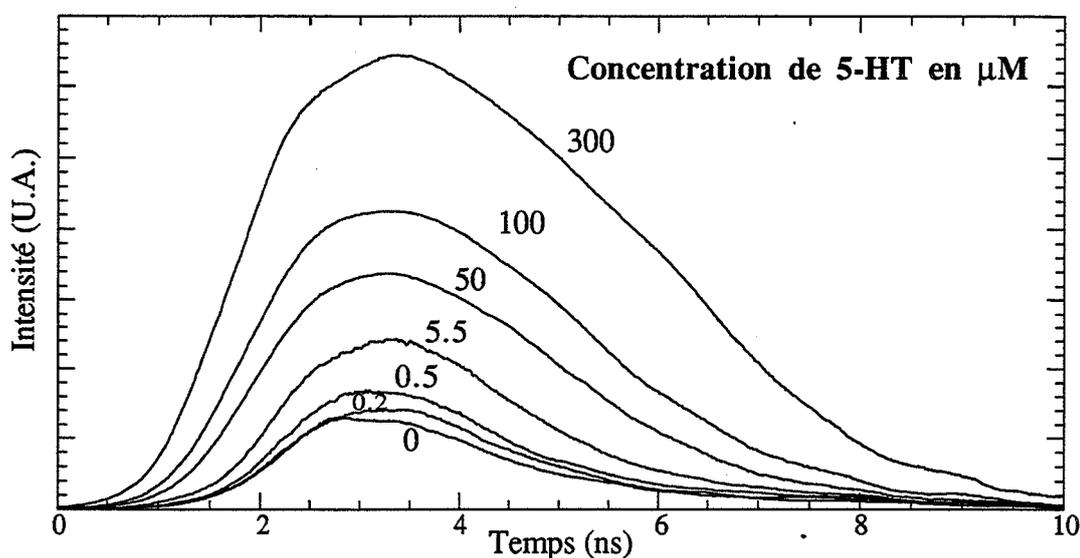
Comparaison de la FRF du PPO en solution dégazée et de la convolution IRF-  
{monoexponentielle de 1.40ns} (en pointillée).

## II.C.2. Mesure en cuvette sans FO de la 5-HT et du 5-HIAA

Avec cette excitation par un laser azote, la dépendance du signal en fonction de la concentration de 5-HT est clairement montrée à la Figure II-16. A cause de la saturation du PM qui intervient quand le flux de photon est trop important, la distorsion de la réponse à la concentration de 300 $\mu$ M apparaît comme un écrasement du maximum. En sens inverse, pour les faibles intensités, la détection est limitée par la fluorescence parasite.

### II.C.2.a. Aire intégrée des FRT

Avec la fluorescence intégrée sur la fenêtre temporelle (10ns) comme seul traitement du signal, la Figure II-17 montre deux courbes d'étalonnage typiques pour les faibles concentrations. Les barres d'erreur donnent la SD sur 5 mesures consécutives. Deux longueurs d'onde d'émission ont été utilisées: 430nm et 450nm. Pour 415 nm le bruit s'est révélé assez important diminuant la zone de linéarité. Cette fluorescence parasite est issue de la luminescence de la cuvette, du tampon (en particulier des poussières). La limite de détection (pour un SNR égal à 2) se situe vers 150nM pour les deux longueurs d'onde d'émission.



**Figure II-16:**

FRT de la 5-HT dans le tampon pH7 à différentes concentrations à une longueur d'émission de 430nm  $\pm$  4nm et pour une excitation par laser azote (337nm).

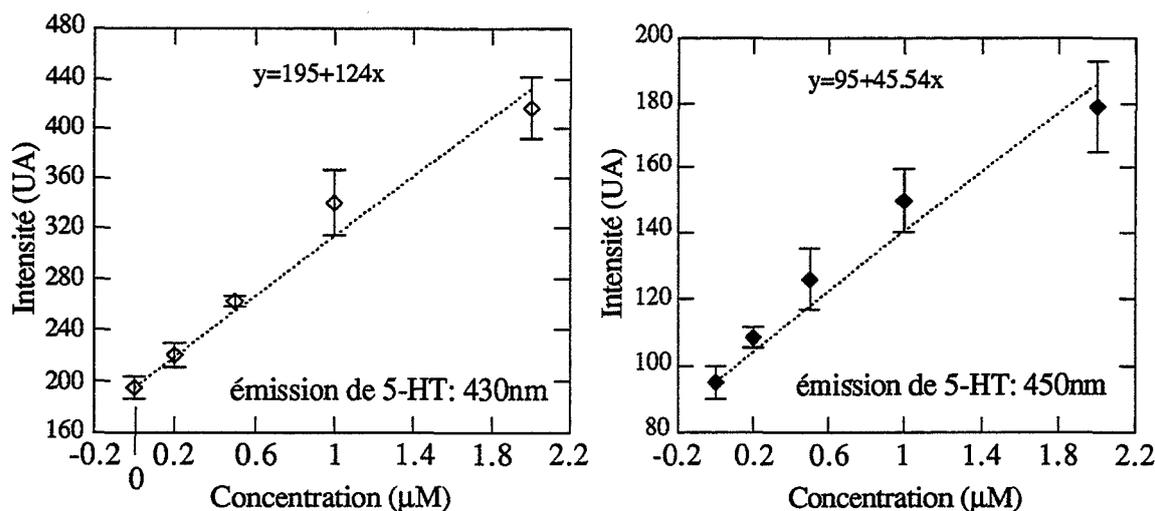


Figure II-17:

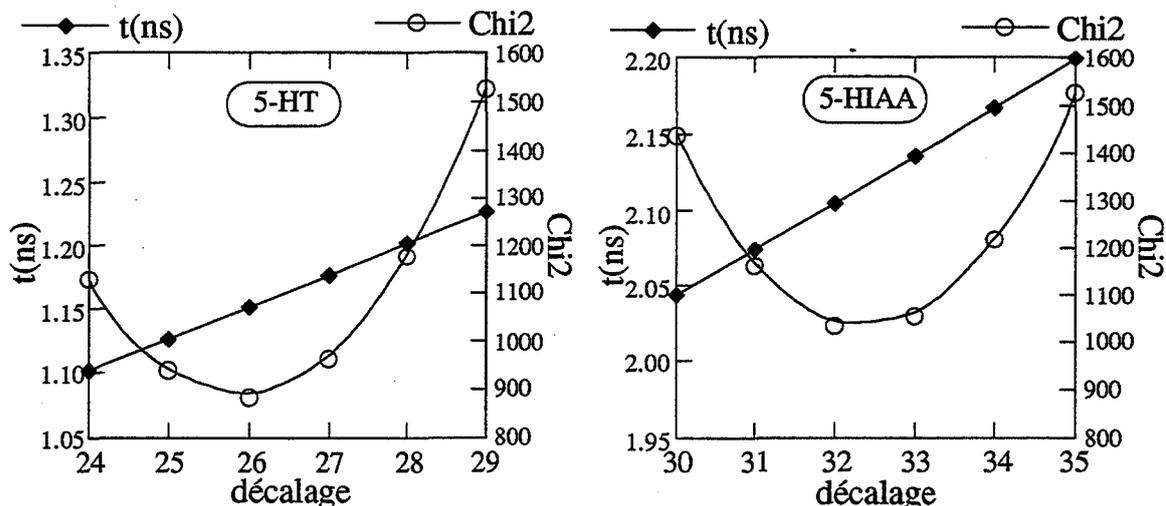
FRT intégrée de 5-HT en cuvette à différentes concentrations à une longueur d'onde d'émission de  $430\text{nm} \pm 4\text{nm}$  et  $450\text{nm} \pm 4\text{nm}$  avec une excitation par laser azote ( $337\text{nm}$ ).

#### II.C.2.a.i. Données temporelles des FRT obtenues sans FO

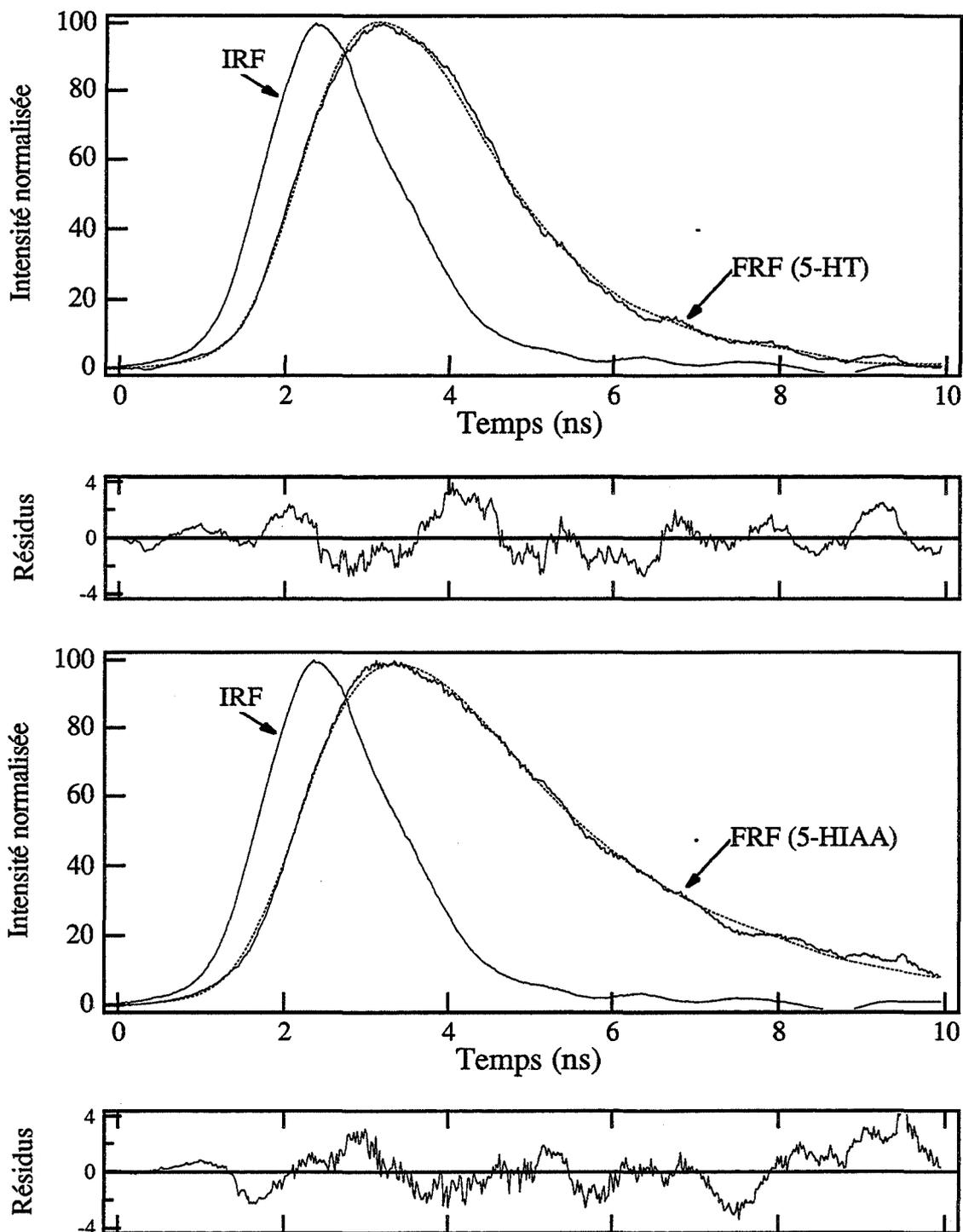
Sur la Figure II-19 nous avons reporté les FRT de la 5-HT et du 5-HIAA réalisées avec une excitation à  $337\text{nm}$  par laser azote et à la longueur d'onde d'émission de  $450\text{nm}$ . Les concentrations utilisées permettent d'être loin des deux extrêmes que nous venons de souligner (fluorescence parasite et dynamique limitée du PM). De plus la concentration élevée de 5-HIAA n'entraîne pas d'effet de "filtre interne" à cause de sa très faible absorption à  $337\text{nm}$  [Mottin,1993]. Comme pour la fluorescence statique l'émission de la 5-HT excitée à  $337\text{nm}$  est environ vingt fois plus importante que celle du 5-HIAA. Par le traitement de donnée par convolution et ajustement par la méthode des moindres carrés précédemment décrit, les temps de déclin de la 5-HT et du 5-HIAA sont respectivement  $1.15 \pm 0.15\text{ns}$  et  $2.1 \pm 0.2\text{ns}$ . La Figure II-18 présente les variations des temps de déclin monoexponentiel et des  $\chi^2$  sans poids des convolutions IRF-monoexponentielle pour la 5-HT et le 5-HIAA en fonction du facteur de correction chromatique (décalage de IRF en nombre de point). La sensibilité du temps calculé de fluorescence en fonction de ce paramètre est à souligner. Ces mesures de FRF correspondent à une moyenne de 256 impulsions laser à  $15\text{Hz}$  (soit un temps d'accumulation de 17 secondes). Pour les FRF de la Figure II-19, le nombre de SPE équivalent par impulsion laser est de 2 et de 3.1 pour la 5-HT et le 5-HIAA. La différence entre les temps de fluorescence de la 5-HT et le 5-HIAA reste comparable pour des niveaux de comptage plus faibles.

La valeur du temps de déclin de la 5-HT mesurée avec notre fluorimètre laser reste compatible avec celles effectuées par l'instrument d'Edinburgh TCSPC pour la même

longueur d'onde d'excitation. De plus une différence notable entre les temps de déclin de la 5-HT et du 5-HIAA est à souligner. Cette différence pourrait permettre de mesurer la 5-HT en présence de 5-HIAA. L'exploitation de cet écart nécessite une mesure précise des temps de déclin et des facteurs pré exponentiels dans un modèle biexponentiel. L'analyse de la contribution de chaque composante à l'émission totale devrait permettre de résoudre l'émission venant de la 5-HT et celle ayant pour origine 5-HIAA dans une proportion de 10%. En tenant compte que la 5-HT émet 20 fois plus que le 5-HIAA, ce moyen permettrait de mesurer une concentration de 5-HT 200 fois inférieure à celle du 5-HIAA ce qui correspond aux niveaux des différences entre ces deux concentrations extracellulaires *in vivo* [Adell,1991].



**Figure II-18:**  
Variations des temps de déclin monoexponentiels  
et des Chi2 sans poids des convolutions IRF-monoexponentielle pour la 5-HT et  
le 5-HIAA en fonction du facteur de correction  
(décalage d'un pas de 0.0195ns) entre l'IRF et la FRF.



**Figure II-19:**  
FRT de la 5-HT ( $30\mu\text{M}$ ) et du 5-HIAA ( $600\mu\text{M}$ )  
dans le tampon pH7 à une longueur d'onde d'émission de  $450\text{nm} \pm 4\text{nm}$ .  
Les convolutions IRF-monoexponentielle de 1.15ns et 2.1ns pour la 5-HT  
et le 5-HIAA sont en pointillées.

### II.C.3. Réalisation d'un capteur chimique à fibre optique

#### II.C.3.a. Effets spectraux et temporels de la FO utilisée

Plusieurs fibres multimodes à saut d'indice ont été testées en vue de sélectionner celle qui présenterait la plus faible autofluorescence sous l'illumination du laser azote. Pour la mesure *in vitro* de la 5-HT nous avons retenu une fibre optique française modèle PCS1000W produite par Quartz et Silice de grande ouverture numérique (O.N. = 0.4, soit un demi-angle d'acceptance de 23.6°) et présentant une bonne transmission UV (perte à 300nm égale à 250dB/Km). Elle est constituée d'un coeur en silice, d'une gaine optique silicone et d'un revêtement protecteur en plastique. Les diamètres du coeur, de la gaine et du revêtement sont respectivement 1000±40 µm, 1260±100 µm et 1550±155 µm. L'autofluorescence de la fibre est significative à l'injection du laser dans la fibre, son maximum étant au dessous de 400nm. La fluorescence générée le long de la fibre est bien plus faible.

Pour notre capteur, la longueur de la fibre est un paramètre important. Plus cette longueur est grande, plus l'autofluorescence provenant de l'embout d'entrée de la fibre sera séparable du signal recherché mais plus la puissance laser excitatrice de la fluorescence à mesurer sera faible, abaissant le niveau du signal. La figure II-20 montre la FRT de 6.2m de PCS1000W. Selon les données fournies par le constructeur "Quartz et Silice", la transmission à 337nm est de 80% de la puissance injectée dans la fibre au bout de 6.2m, correspondant à l'atténuation de 150dB/Km. L'atténuation théorique limitée à la diffusion Rayleigh s'exprime par  $A = \frac{0.8}{\lambda^4}$  avec A en dB/Km et  $\lambda$  en µm. Plus la longueur

d'onde de la lumière à guider est dans l'UV plus l'atténuation est importante. Pour 337nm cette atténuation théorique s'élève à 62.8dB/Km soit au bout de 6.2m de fibre une transmission de 97.9%. La Figure II-21 montre la différence entre l'atténuation théorique et l'atténuation réelle de la PCS1000W sur le domaine 250-350nm. Finalement une dizaine de mètres de PCS1000W permet de guider encore suffisamment la lumière du laser.

Une longueur typique de 6m a été choisie en tenant compte de l'autofluorescence de la fibre (pic A). Il faut remarquer que celle-ci n'intervient plus au bout des 6m (voir la Figure II-20). Nous abordons ici un aspect essentiel de l'utilisation de la FRT pour notre capteur: **le filtrage temporel**. Le temps que met la lumière pour parcourir l'aller-retour des 6.2m de fibre est de 65.5ns comme le montre la Figure II-20. Ce temps est en accord avec les durées calculées avec le modèle géométrique des guides optiques [Snyder,1983]. Avec ce modèle les temps de propagation s'expriment par ces deux équations:

$$\Delta t_{\max} = \frac{L}{c \sqrt{(1-ON^2)}}(n_1^2 + n_2^2) \text{ et } \Delta t_{\min} = \frac{L}{c}(n_1^2 + n_2^2)$$

avec  $n_1$  (1.467) et  $n_2$  (1.479) les indices de réfraction du cœur respectifs à 415nm et 337nm.

Ce qui donne  $\Delta t_{\min} = 60.9\text{ns}$  et  $\Delta t_{\max} = 66.4\text{ns}$ .

Dans une fibre multimode l'élargissement temporel de l'impulsion par la fibre vient de la dispersion des divers modes appelée dispersion modale ainsi que de la dispersion propre au matériau constituant le cœur appelée dispersion chromatique. Cependant l'effet d'élargissement dû à la dispersion modale est négligeable pour notre application au vu des faibles longueurs de fibre utilisées. Avec des impulsions de 300ps à mi-hauteur, Carroll montrent que cet effet commence à être sensible pour des longueurs de fibre supérieures à 100m [Carroll,1991].

L'autre effet généré par les FO, la dispersion chromatique, est lié aux propriétés optiques du cœur. La variation de l'indice de réfraction de la silice de la FO en fonction de la longueur d'onde entraîne une variation du temps de transit de la lumière suivant la longueur d'onde. Nous verrons plus bas que cette dispersion chromatique nécessite un décalage temporel de l'IRF par rapport à la FRF car cette première est mesurée à 337nm par diffusion et la seconde à partir de 390nm jusque dans le rouge.

Dans une fibre multimode à saut d'indice de longueur  $L$ , le temps de transit  $t$  d'une impulsion monochromatique est déterminé essentiellement par la vitesse de groupe  $v_g$  dans le matériau du cœur de la FO:

$$t = \frac{L}{v_g} \text{ avec } v_g = \frac{c}{n} \left( 1 + \frac{\lambda}{n} \frac{dn}{d\lambda} \right).$$

La dispersion chromatique s'exprime par  $\frac{dt}{d\lambda} = - \frac{\lambda L}{c} \frac{d^2n}{d\lambda^2}$ . Ainsi entre des photons de longueur d'onde 400nm et ceux de 900nm la différence du temps de transit pour un cœur en silice est de 163ns/Km; le rouge se propageant plus vite. L'effet de dispersion chromatique des FO a été utilisé comme élément disperseur au même titre qu'un polychromateur à sélection temporel [Orofino,1976], [Whitten,1979].

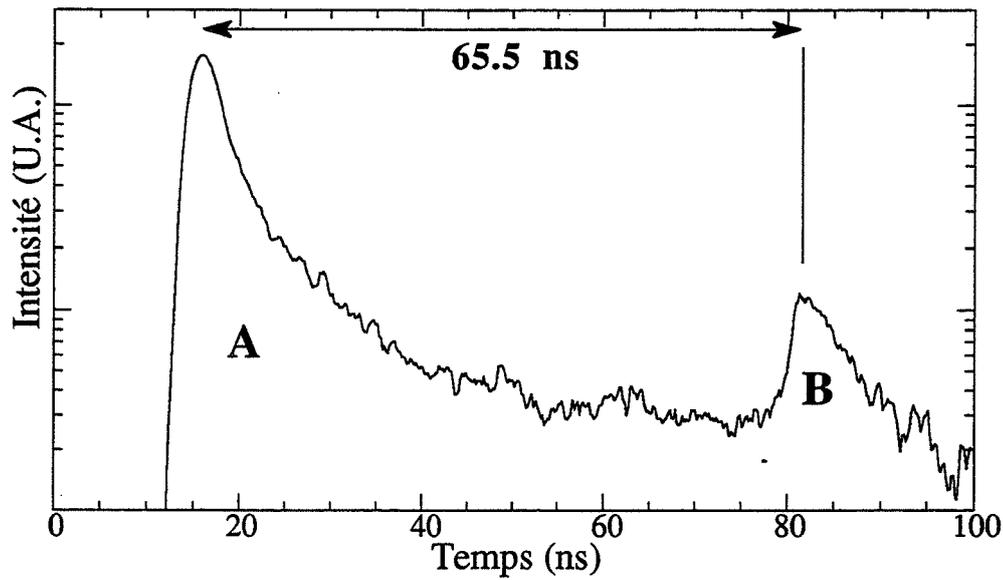


Figure II-20:

Intensité d'émission en échelle logarithmique à 415nm de 6.2m de fibre optique PCS1000W avec l'embout (pic B) plongeant dans le tampon.  
Le pic A est l'autofluorescence de la fibre à l'injection du laser azote.

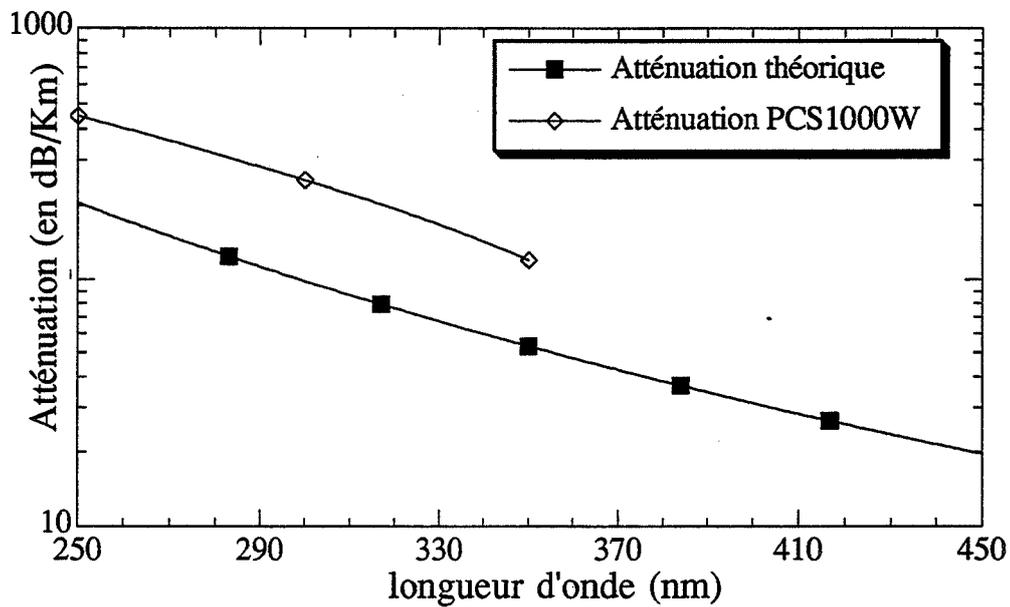


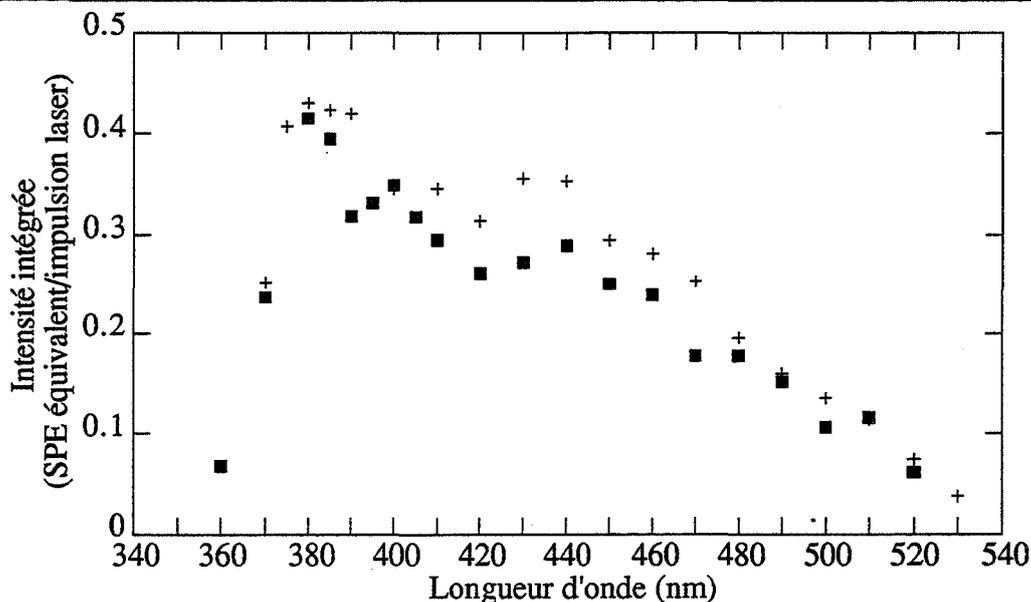
Figure II-21:

Atténuation théorique (due à la seule diffusion de Raileigh)  
et atténuation de la fibre optique PCS1000W  
en fonction de la longueur d'onde

### II.C.3.b. Spectres d'émission de la FO et de la 5-HT mesurés par le FOCS

#### II.C.3.b.i. Spectre d'émission de la FO

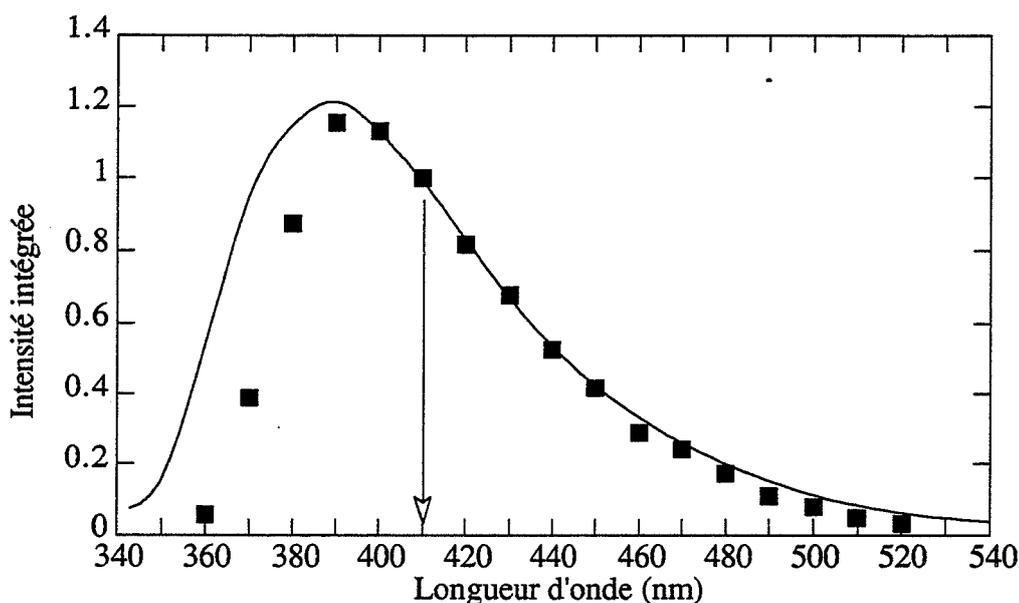
Nous rapportons sur la Figure II-22 le spectre d'émission de la fibre optique dont l'embout est plongé dans le tampon pH7. L'intensité en ordonnée est indiquée en SPE équivalent par impulsion laser. Le tampon à pH7 présente une fluorescence négligeable et la FO, dont l'embout est dans l'air, présente le même spectre. Cette autofluorescence de la FO mesurée avec notre appareil présente un pic apparent situé vers 380nm.



**Figure II-22:**  
Spectres d'émission de la FO  
plongée dans le tampon pH7 pour une fenêtre temporelle de 10ns  
(les deux spectres ont été enregistrés à un jour d'intervalle)

#### II.C.3.b.ii. Spectre d'émission de la 5-HT

Nous avons reporté sur la Figure II-23 deux spectres expérimentaux de la 5-HT dissous dans le tampon pH7 normalisés à un pour la longueur d'onde de 410nm. Le spectre représenté en trait plein a été mesuré par fluorescence statique et sans FO. Le spectre marqué par des ■ correspond à celui obtenu avec notre appareillage et avec l'utilisation des FO. La correspondance pour les longueurs d'onde supérieures à 400nm est satisfaisante. Pour les longueurs d'onde inférieures à 390nm, l'effet du miroir dichroïque du montage qui réfléchit l'UV est sensible. Celui-ci entraîne une diminution de l'intensité mesurée.



**Figure II-23:**

Comparaison des spectres d'émission de la 5-HT dans du tampon pH 7 soustraits du bruit et normalisés à 1 à 410 nm (en trait continu: fluorescence statique  $\lambda_{exc}=335$  nm; points marqués par ■: mesure par le FOCS  $\lambda_{exc}=337$  nm)

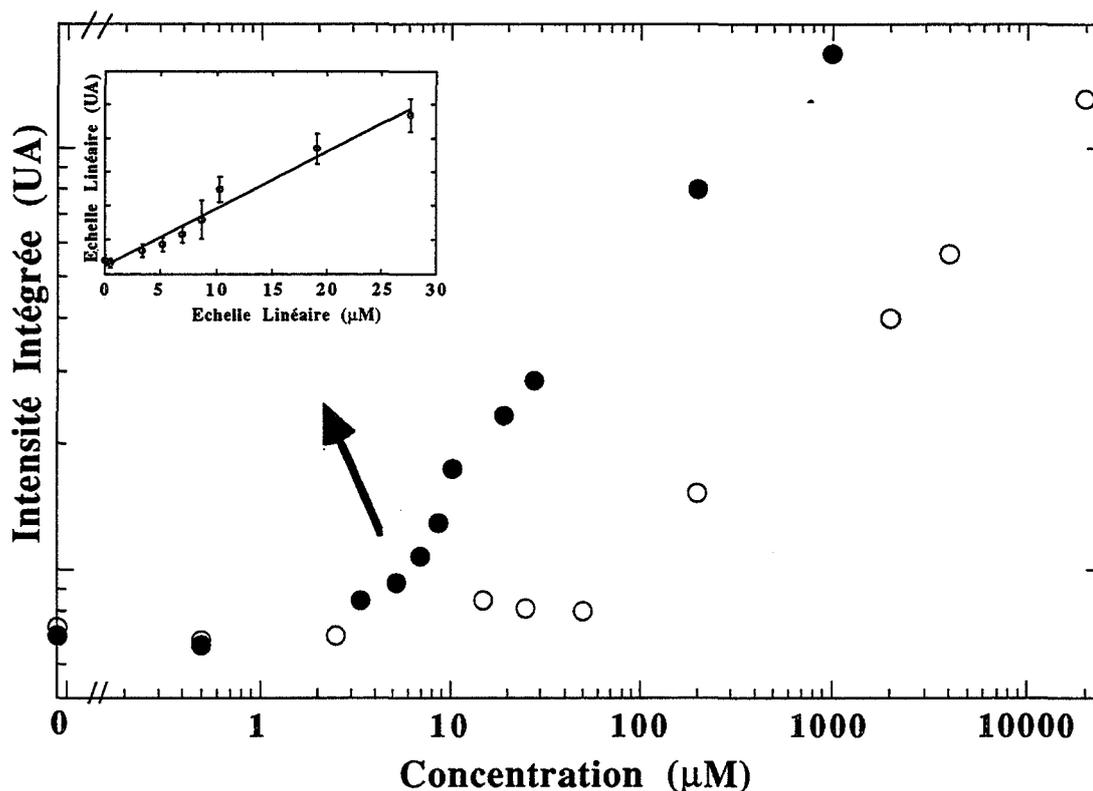
### II.C.3.c. Relation concentration-signal pour la 5-HT et le 5-HIAA

La mesure a été réalisée à l'optimum du SNR c'est-à-dire à la longueur d'onde d'émission de 415 nm avec une largeur spectrale de 4nm.

La Figure II-24 donne un résultat typique de réponse du FOCS pour la 5-HT et le 5-HIAA. L'émission est collectée sur une même fenêtre temporelle (10ns pleine échelle). La différence d'émission entre ces deux composés est bien marquée pour une excitation par le laser azote. Pour un signal semblable (en intensité intégrée), la concentration de 5-HT est à peu près vingt fois inférieure à celle du 5-HIAA.

La dynamique de mesure s'étend sur deux décades:

- aux faibles concentrations, la limite est fixée par le bruit c'est-à-dire, pour notre capteur, la fluorescence parasite mesurée à la longueur d'onde du domaine d'émission de la 5-HT,
- aux fortes concentrations, la limite est déterminée par la saturation du PM (Figure II-25).

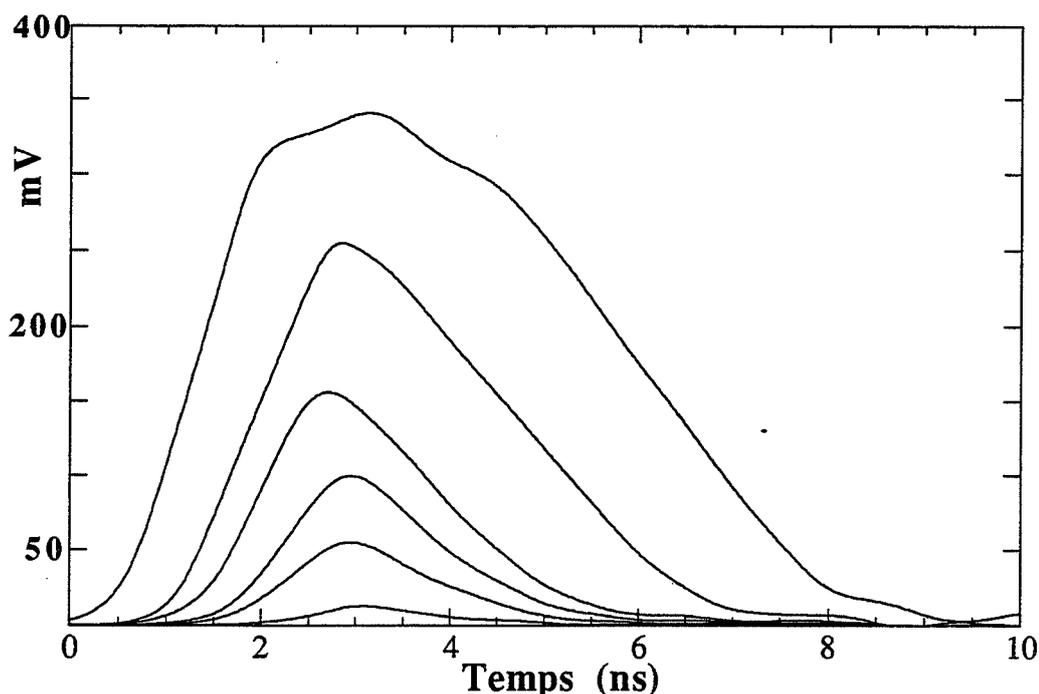


**Figure II-24:**  
Intensité de l'émission de fluorescence  
dans le tampon Merk à pH7,  
en fonction de la concentration de 5-HT (●) et de 5-HIAA (○).  
La longueur d'onde d'émission est 415 nm avec une largeur instrumentale de 4 nm.  
La longueur d'onde d'excitation est 337 nm.

Afin de couvrir l'ensemble des concentrations de la 5-HT et du 5-HIAA et la dynamique de mesure, nous avons choisi une représentation log-log. Une représentation linéaire pour la 5-HT est aussi indiquée avec en plus les barres d'erreur correspondant à la SD (déviation standard) sur 5 mesures consécutives.

Avec 415 nm comme longueur d'onde d'émission, 5 μM de 5-HT et 100 μM de 5-HIAA sont les ordres de grandeur des limites de détection.

Or nous avons vu précédemment que les niveaux des concentrations extracellulaires endogènes de la 5-HT et du 5-HIAA dans différentes régions du cerveau du rat sont dans le domaine de 1 nM à 100 nM et 100 nM à 5 μM respectivement. Avec l'appareil développé et les différents choix techniques il n'a pas été possible de réaliser un FOCS ayant une détection limite de 5-HT inférieure à 1 μM.



**Figure II-25:**  
 Intensité à 415nm exprimée en mV  
 (le phénomène de saturation du PM est clairement indiqué  
 pour les tensions de 300mV).

#### II.C.3.d. Discussion pour l'amélioration du SNR

Plusieurs améliorations importantes sont nécessaires pour arriver à des détections limites de 5-HT de l'ordre des niveaux *in vivo*.

La méthode la plus directe serait d'adopter une configuration bi-fibre qui réduirait considérablement le niveau de fluorescence parasite [Louch, 1988]. Le principal problème vient de la fluorescence parasite générée par l'embout de la fibre au niveau de l'injection du laser et d'une luminescence le long de la fibre. Cependant le choix de la configuration mono-fibre est de beaucoup plus satisfaisante pour les applications *in vivo* (taille et simplicité; voir le chapitre III).

L'amélioration la plus importante concerne la fibre elle-même ce qui peut impliquer le développement d'une FO spéciale. Les perfectionnements attendus sont essentiellement situés au niveau de la recherche de la plus faible luminescence de la fibre. En outre le gain en transmission UV permettrait le passage d'une transmission à 337 nm de l'ordre de 80% à la transmission limite théorique de 97.9% au bout de 6.2 m de fibre (Figure II-21). Ce progrès possible de la transmission n'est pas critique en lui-même mais devrait conduire en plus à une réduction de la fluorescence parasite. Une diminution d'un ordre de grandeur de cette fluorescence semble possible. Quelques tests de FO

spéciale UV ont montré une fluorescence bien moindre (voir le chapitre "Conclusion et perspectives"). En particulier l'ouverture vers des fibres d'ON de 0.2 élargit le choix mais rend les conditions d'injection plus difficiles. Le faisceau du laser azote présente une large divergence (>10 mrad) et n'est pas adapté à une injection "peu bruyante". D'autres lasers (YAG ou Sa:Ti) offrent des faisceaux plus faciles à collimater (divergence <1 mrad) ce qui devrait très largement réduire le niveau du "parasite" lié à l'injection. De plus nous avons montré, lors de l'étude des propriétés photophysiques de la 5-HT, que la longueur d'onde du laser azote n'est pas optimale. Un laser émettant à 325 nm permettrait d'augmenter la fluorescence de la 5-HT d'un facteur deux (Figure II-5). Et le passage de 337 nm à 325 nm ne devrait pas conduire à élévation importante du bruit.

La combinaison d'un laser subnanoseconde accordable 270 nm à 337 nm, de bonne qualité de faisceau, et de fibre de qualité UV basse luminescence devrait donc permettre d'atteindre des détections limites s'approchant des exigences *in vivo*.

L'utilisation des données temporelles de la FRT et d'un traitement du signal adapté devrait aboutir à améliorer le SNR comme nous allons le souligner ci-dessous.

#### II.C.3.e. Données temporelles

La méthode de FRT permet en principe un traitement du signal plus raffiné que la simple intensité intégrée. Les données temporelles conduisent à un autre paramètre : le temps de déclin.

Dans la pratique, la réponse doit être déplacée temporellement essentiellement à cause de la dispersion chromatique dont l'origine vient de la variation de l'indice de réfraction de la silice de la FO en fonction de la longueur d'onde. Ce décalage intervient car l'IRF est mesuré à 337nm par diffusion et la FRF à partir de 390nm jusque dans le rouge. La Figure II-26 indique en ps l'ordre de grandeur de ce décalage par rapport à l'IRF en utilisant la formule classique:

$$\Delta t = \frac{L \Delta n(\lambda)}{c}$$

avec L longueur de propagation ( $L = \frac{\ell}{\cos(\arcsin(O_N))}$  en ayant  $\ell$  longueur de fibre et  $O_N$  ouverture numérique), c vitesse de la lumière et  $\Delta n(\lambda) = n(\lambda) - n(337\text{nm})$ . La courbe  $n(\lambda)$  a été déterminée par interpolation des valeurs expérimentales pour la silice à 15°C [Handbook 62<sup>ième</sup> édition].

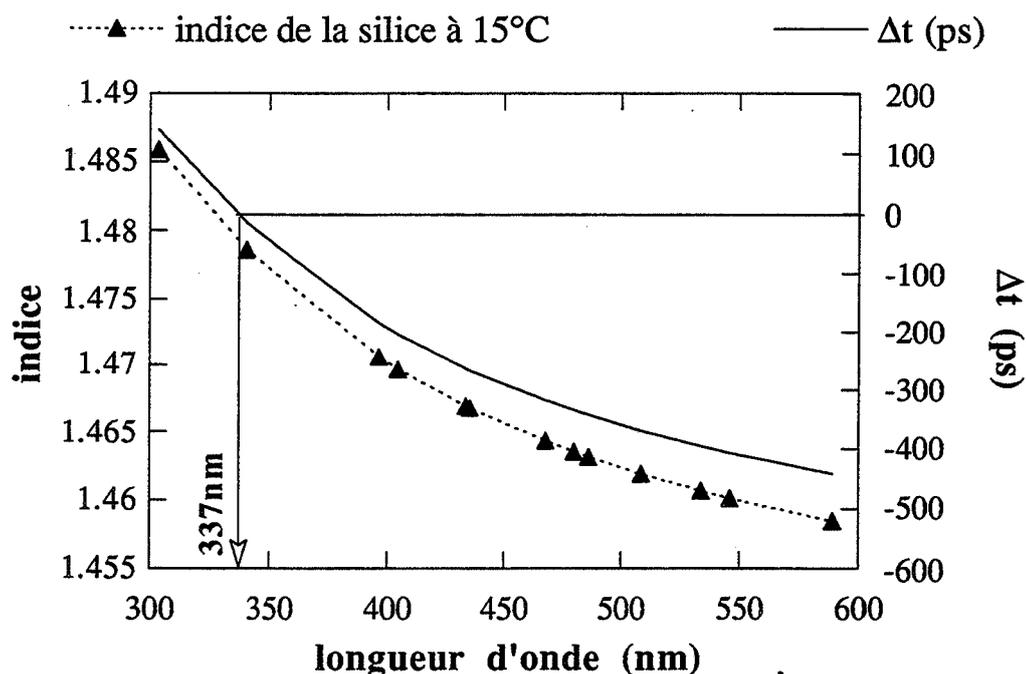
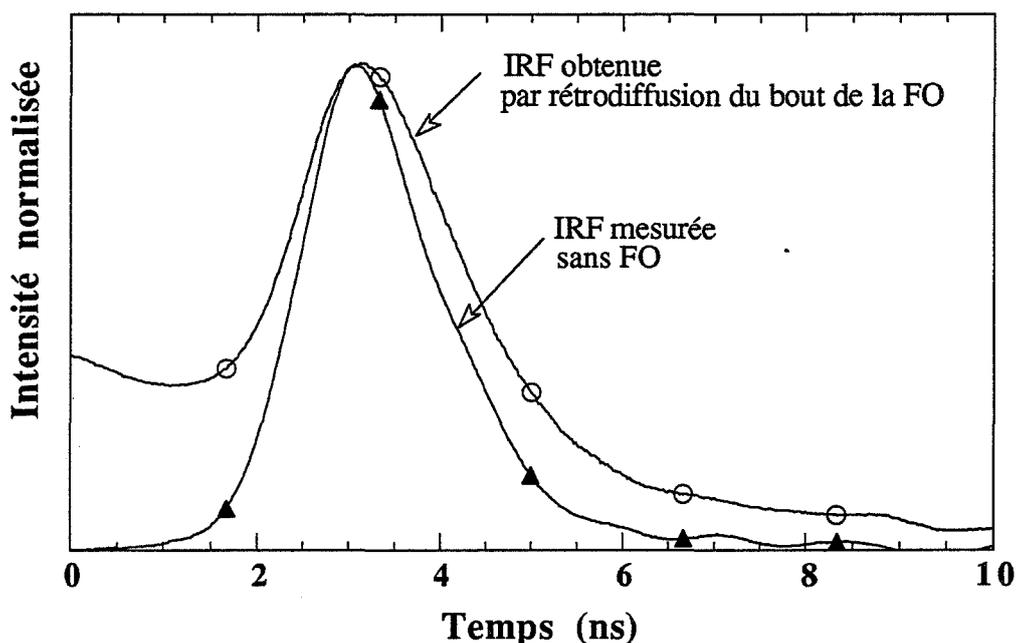


Figure II-26:

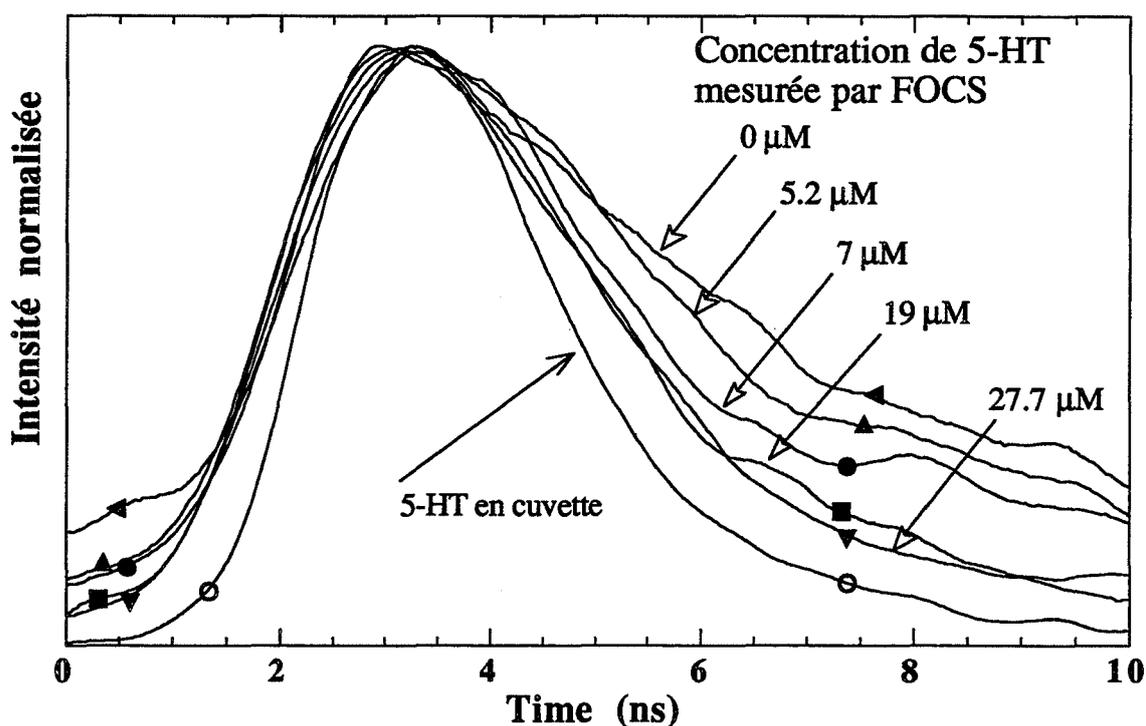
Variation de l'indice de réfraction de la silice à 15°C et du décalage chromatique ( $\Delta t$ ) pour 6.2m de FO en fonction de la longueur d'onde, ( $\Delta t$  est exprimé en ps par rapport à 337nm, le rouge se propageant plus vite)

La mesure de l'IRF par rétrodiffusion de la lumière laser du capteur entraîne un élargissement et une déformation de celui-ci (Figure II-27). Ainsi l'IRF ne peut être mesurée systématiquement avant et après chaque mesure. Pour extraire le temps de fluorescence du signal, nous avons utilisé des IRF mesurées en cuvette sans FO. Cette façon de procéder diminue la précision du temps de déclin calculé car elle ne tient pas compte des variations temporelles du PM et de l'électronique. Si des temps de déclin plus précis doivent être mesurés par notre instrument, la méthode de calibration interne utilisant des temps de fluorescence de référence de corps chimiques comme le POPOP (*p*-bis[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene) or PPO (2,5-diphenyloxazole) peut être mise en oeuvre [Lampert,1983], [Castelli,1985].



**Figure II-27:**  
IRF mesurées sans FO et avec FO par diffusion du laser azote

Des FRF typiques mesurées par le FOCS sont présentées sur la Figure II-28. Celles-ci ont été renormalisées afin de souligner les différences temporelles entre le bruit (correspondant au signal enregistré pour le tampon seul) et le signal de fluorescence à diverses concentrations de la 5-HT. Avec une longueur d'onde d'émission de 415 nm, les temps de déclin expérimentaux de la 5-HT (27.7  $\mu\text{M}$ ) et du 5-HIAA (200  $\mu\text{M}$ ) sont respectivement de 2 et 3 ns. Ces temps de déclin apparents sont plus longs que ceux mesurés en cuvette sans FO. Notre objectif principal en utilisant les fibres n'est pas de mesurer avec précision les temps de fluorescence mais d'extraire à partir du signal une évaluation d'une concentration, d'atteindre le meilleur SNR et enfin d'obtenir divers paramètres supplémentaires pouvant conduire à des informations qualitatives pertinentes.



**Figure II-28:**  
FRF mesurées en cuvette (○) et par FO à 415nm (symboles pleins)  
à diverses concentrations de 5-HT

Au vu de ces résultats, une analyse plus poussée des temps de déclin en fonction de la concentration a été développée. La fluorescence parasite mesurée à l'embout de la fibre possédant un temps apparent trois fois plus important que celui de la 5-HT, une identification par une bi-exponentielle attribuée à ces deux fluorescences peut être réalisée. En fixant des temps de 1.3 et 4.65ns pour la 5-HT et la fluorescence parasite, le Tableau II-13 donne une évaluation du rapport entre ces deux fonctions exponentielles en fonction de la concentration de 5-HT. Le rapport  $r$  est défini par:  $\exp(-\frac{t}{\tau_n}) + r \exp(-\frac{t}{\tau_0})$  où  $\tau_n$  et  $\tau_0$  sont les temps de déclin de la fluorescence parasite et de 5-HT respectivement. De plus les évaluations du temps apparent monoexponentiel et de la variation relative du  $\chi^2$  ( $\chi_m^2 - \chi_b^2$ )/ $\chi_m^2$  (où  $\chi_m^2$  et  $\chi_b^2$  sont les  $\chi^2$  de l'ajustement pour les modèles monoexponentiel et biexponentiel) sont indiquées en fonction de la concentration de 5-HT.

Un des éléments encourageants est le fait que le modèle biexponentiel diminue le  $\chi^2$  pour des valeurs de  $r$  raisonnables. En dépit du faible temps d'acquisition et du niveau réduit d'intensité lumineuse, l'analyse du rapport  $r$  est pleine de promesses dans l'optique d'extraire la fluorescence de la 5-HT du bruit. Nous avons déjà vu que l'analyse

temporelle de la fluorescence donne des informations qualitatives. Mais ici nous abordons quelques pistes du traitement du signal de fluorescence résolue en temps utilisable pour acquérir des données quantitatives. Finalement ces informations issues du traitement par un modèle biexponentiel pourrait permettre d'atteindre une détection limite encore plus petite que celle obtenue en utilisant la simple intensité intégrée. D'autant plus si le laser qui équipera la deuxième génération de l'appareillage permet un comptage plus important. De plus l'élimination de la composante "bruit" liée à la FO peut être facilitée si le temps moyen de déclin des nouvelles fibres diffèrent plus largement des temps de fluorescence à mesurer.

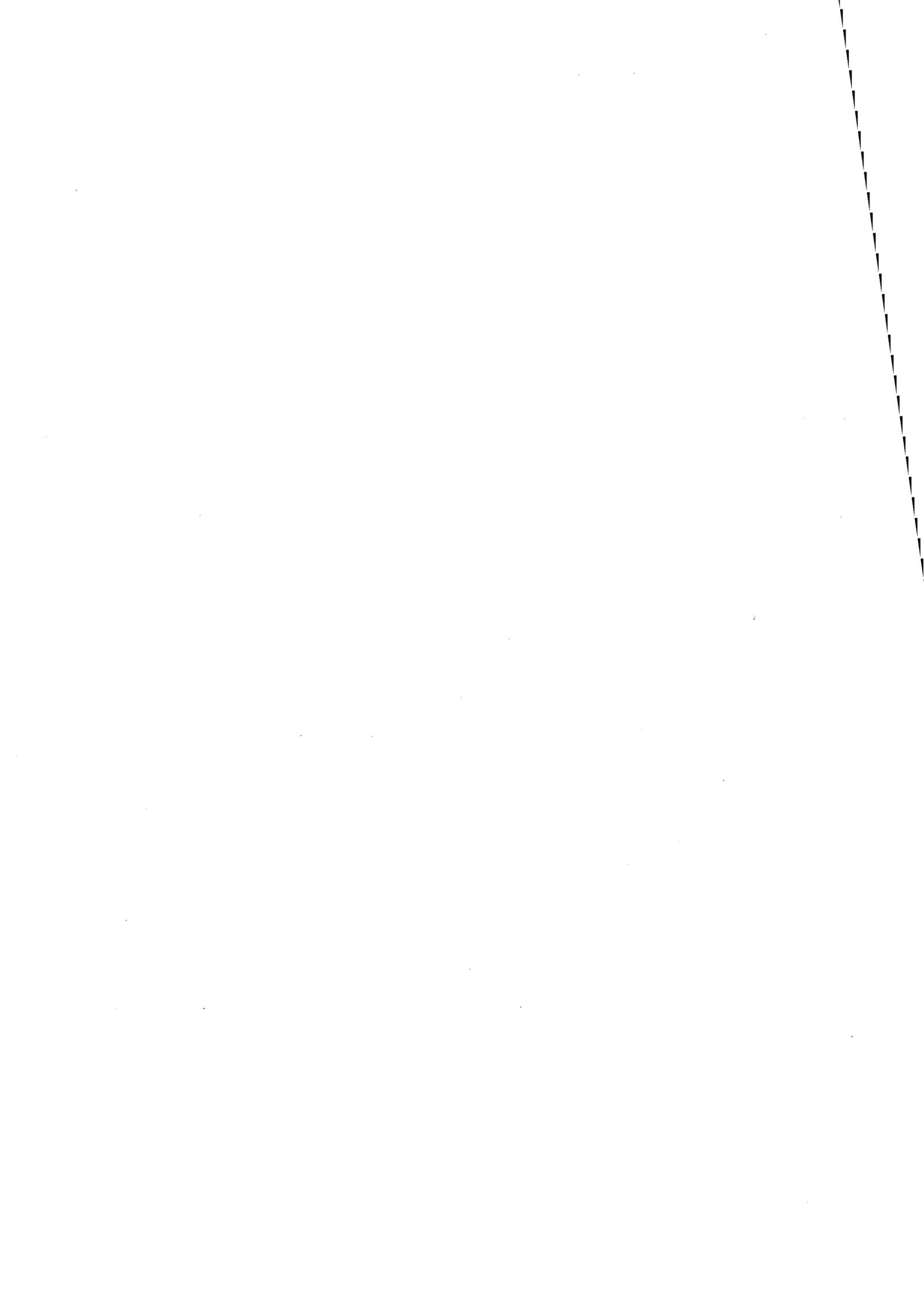
Concentration 5-HT ( $\mu\text{M}$ )	temps de déclin monoexponentiel (ns)	Ratio (biexponentiel)	Variation relative du $\chi^2$
0.0	4.65	0.06	16%
0.5	4.1	0.35	31%
3.4	4.4	0.2	17%
5.2	3.7	0.6	48%
7.0	3.15	1.2	61%
8.7	2.8	1.7	66%
10.3	2.0	4.0	50%
19.1	2.1	4.4	-6%
27.7	2.0	4.7	-9%

**Tableau II-13:**

Analyse temporelle par un modèle biexponentiel de la fluorescence de la 5-HT mesurée par un FOCS.



**Chapitre III:**  
**MESURE *IN VIVO***



## RÉSUMÉ

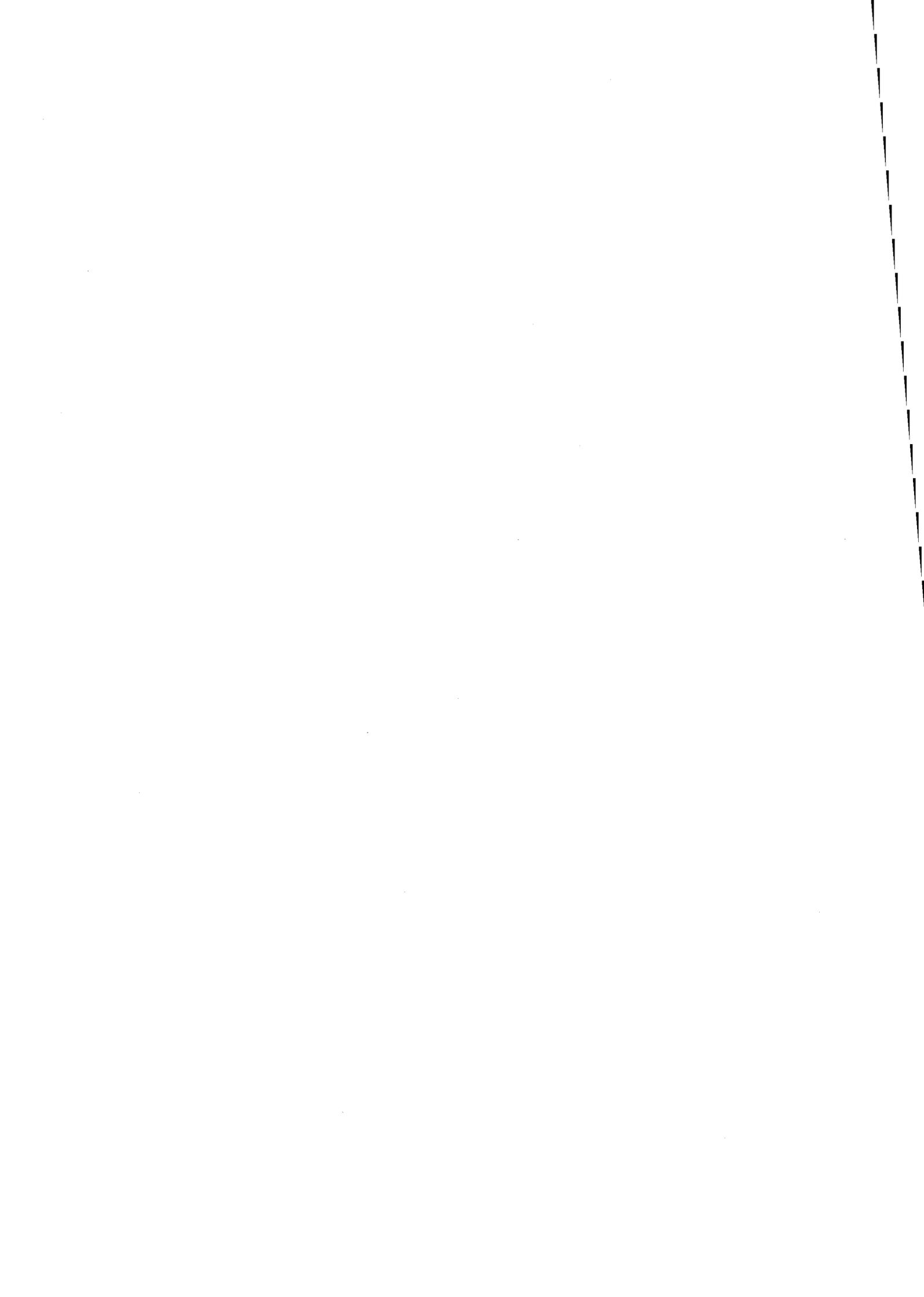
Les résultats de la fluorescence résolue en temps observée *in vivo* au niveau du cortex (Cx) et du noyau du raphé dorsalis (nRD) chez le rat non anesthésié sont analysés spectralement et temporellement.

Deux pics ont été déterminés: un situé à 390 nm et l'autre centré sur 460 nm. Le premier pic (390 nm) n'a pas encore d'attribution moléculaire sûre. Les données spectroscopiques et la littérature de l'autofluorescence des tissus cérébraux, pic mesuré à 460 nm, permettent cependant une attribution moléculaire (NADH endogène) plus fiable.

Quelques résultats préliminaires ont été obtenus pendant les divers états de vigilance avec le FOCS implanté dans deux structures cérébrales (Cx et nRD). Au niveau de la partie antérieure et ventrale du nRD, une augmentation de la fluorescence (460 nm) a été observée lors du sommeil à ondes lentes (SWS) et du sommeil paradoxal (PS). Au niveau du Cx une phénoménologie inverse semble exister.

En outre, une augmentation importante et rapide de la fluorescence (460nm) a été mesurée lors de la mort de l'animal. Cet effet est principalement causé par l'arrêt brutal de l'oxygénation.

La cinétique de la fluorescence (415 nm et 460 nm) du nRD a été mesurée lors d'injection de 3 substances intervenant sur le métabolisme sérotoninergique. La réserpine et la sertraline entraînent une augmentation du signal alors que la tianeptine le laisse inchangé.



### III. Mesure *in vivo*

#### III.A. Analyse des travaux antérieurs

##### III.A.1. Développement de capteur chimique à fibre optique (FOCS)

Au niveau européen, la recherche sur les capteurs biochimiques *in vivo* est encore dans la phase de l'Action Concertée initiée en 1989 [Alcock,1992].

Concernant les FOCS, nous avons vu au chapitre I "Matériel et méthodes" que l'intérêt pour les applications biomédicales s'affirme au premier plan dans les développements récents, avec une nette préférence pour les capteurs semi-intrinsèque à fluorescence statique.

Les espoirs dominants concernant les FOCS sont attachés aux aspects: miniaturisation, stérilisation, biocompatibilité (meilleure que les capteurs électrochimiques) et aide au diagnostic en temps réel.

Notre démarche est volontairement différente de la majorité des recherches dans ce domaine car notre premier objectif est la conception et la réalisation d'un microcapteur implantable chez le rongeur en conditions chroniques. Les substances que nous désirons en premier lieu mesurer ayant des propriétés photophysiques directement exploitables (indol, NADH), nous nous sommes orientés vers la réalisation d'un microcapteur extrinsèque. L'originalité de notre approche, dans le domaine de l'instrumentation des FOCS par RFF consiste:

- à adapter certaines techniques de fluorescence afin d'atténuer les inconvénients liés aux microcapteurs à fibre optique (fluorescence des fibres optiques, optimisation du SNR...);
- à traiter le maximum d'information que le signal lumineux peut véhiculer par la FO (données spectrales et temporelles);
- à réaliser un appareillage permettant une mesure cérébrale rapide (<30s) *in vivo* chez l'animal non anesthésié et libre de tous mouvements, sur une période d'au moins 24h tout en préservant la simplicité de fabrication, de nettoyage et de stérilisation de l'embout du capteur.

Dans le domaine du génie biomédical, les développements actuels de FOCS peuvent être classés en deux catégories:

☞ la première est orientée vers l'aide à la chirurgie:

- thérapie photodynamique pour la localisation de tumeurs, de plaques ischémiques, ou pour la photosensibilisation [Boulnois,1988], [Hirano,1989], [Andersson,1989], [Andersson,1990];

— surveillance de la vie cellulaire et de sa qualité (mesure de NADH des organes) [Mayevsky,1982], [Renault,1987a].

☞ la seconde est axée sur l'aide au diagnostic au sens large et notamment sur la mesure en temps réel des variations des concentrations de composés présents dans certains fluides ou les tissus vivants [Peterson,1980], [Sepaniak,1983], [Peterson,1984], [Gehrich,1986], [Chappey,1990].

### III.A.2. Etat de l'art des FOCS *in vivo* pour les espèces chimiques d'intérêt clinique

Les espèces chimiques d'intérêt clinique majeur qui ont tout d'abord attiré l'attention sont [Alcock,1992]:

- le glucose dont la mesure *in vivo* sur plusieurs semaines constitue encore à l'heure actuelle le verrou technologique pour la réalisation d'un pancréas artificiel. En ce qui concerne le diagnostic rapide de ce composé, au centre de la problématique du diabète, le nombre de capteur développé se chiffre à plus d'une dizaine de capteurs *in vivo* (essentiellement capteurs ampérométriques),
- l'oxygène dont la mesure *ex vivo* est au stade commercial et clinique. Cependant sa détection *in vivo* reste encore dans le domaine de la recherche. Les méthodes analytiques utilisées sont électrochimiques (électrode de Clark), photophysiques (méthode d'inhibition de la fluorescence de fluorophores) ou spectroscopique (proche IR, absorption des complexes déoxyhémoglobine, oxyhémoglobine et du cytochrome aa<sub>3</sub> [Hoshi,1993]),
- le NADH, dont l'actualité de la mesure clinique est marquée par les possibilités de l'imagerie de fluorescence du tissu (enregistrement vidéo). Les développements de ces techniques chez l'animal sont au stade de la mesure chez le rat anesthésié et ventilé mécaniquement. Le suivi de la respiration cellulaire de la surface d'organes pendant une opération chez l'homme est un des objectifs réalisables à court terme.
- les ions H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Actuellement la mesure des variations du pH dans la gamme physiologique est réalisée principalement par des ISFET (pH-ion-selective field effect transistors). Ces capteurs *in vivo* posent cependant des problèmes de stabilité. Pour cet aspect, l'état de l'art se situe à la frontière entre la recherche et le développement.

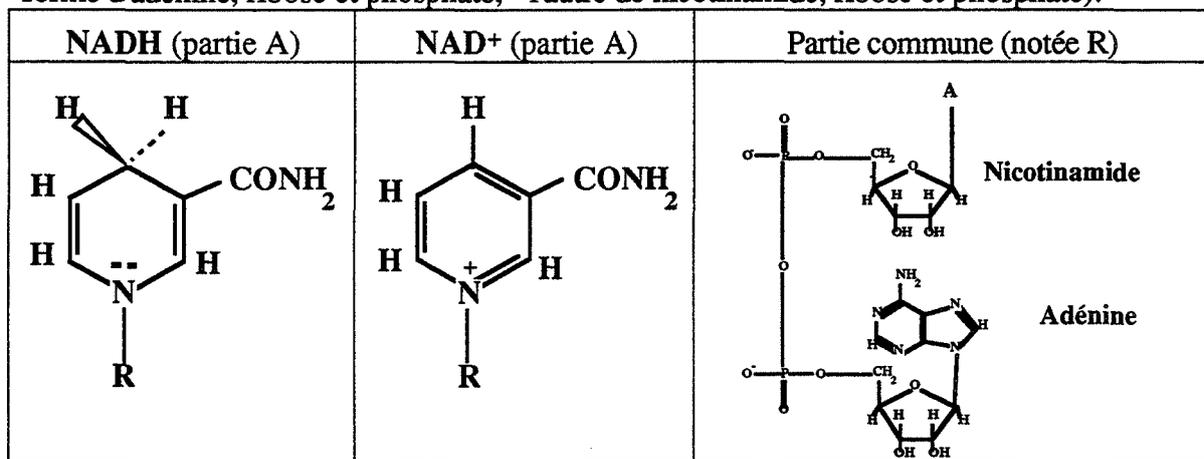
Il est reconnu que le temps nécessaire au développement de capteurs *ex vivo* ou *in vivo* est assez long. Il a fallu en effet 30 ans pour développer des appareillages capables de mesurer les gaz dissous dans le sang. Il est reconnu qu'après 15 ans d'améliorations techniques des capteurs positionnés dans des cathéters, il faudra vraisemblablement

encore 15 ans, pour réaliser des mesures en continu et *in vivo* de façon fiable [Alcock,1992].

### III.B. Rappels sur la fluorimétrie cérébrale *in vivo*

#### III.B.1. Le NADH

La molécule de NAD comprend un cycle nicotinamide (noyau pyridine) lié à un cycle adénine par un pont diphosphorique (le NAD a été également appelé DPN DiphosphoPyridine Nucléotide, sa structure étant vue comme deux nucléotides -l'un formé d'adénine, ribose et phosphate, - l'autre de nicotinamide, ribose et phosphate):

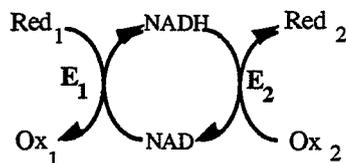


La nicotinamide possède un ammonium quaternaire ce qui explique l'écriture sous la forme NAD<sup>+</sup> lorsqu'il est sous la forme oxydée. La forme réduite est dénommée NADH, l'azote étant ternaire. Très voisin du NADH/NAD<sup>+</sup>, le couple NADPH/NADP<sup>+</sup> anciennement appelé TPN TriPhosphopyridine Nucléotide, ne diffère du précédent que par un résidu phosphate supplémentaire en position 2 du ribose lié à l'adénine.

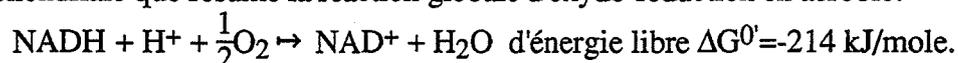
Le NAD<sup>+</sup> libre, c'est-à-dire non fixé à une enzyme (une déshydrogénase par exemple), se trouve en solution sous deux types de configurations, l'une est la forme ouverte, l'autre est la forme fermée; dans ces deux formes les noyaux plans de la nicotinamide et de l'adénine sont parallèles entre eux. La forme fermée prédomine en solution, mais lorsque le NAD<sup>+</sup> se fixe sur une déshydrogénase, il acquiert alors une conformation ouverte.

La structure de cette molécule explique aussi ses propriétés biologiques. La réduction aisément réversible de la partie nicotinamide permet au couple NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> d'être un puissant oxydo-réducteur:  $\text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow \text{NADH(P)}$ . L'équation du potentiel d'oxidation-réduction est la suivante:  $E_h(\text{Volt}) = -0.32 - 0.03 \text{ Log} \left( \frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+][\text{H}^+]}\right)$

Le couple NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> est aussi le coenzyme de nombreuses réactions de déshydrogénation. En notant E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub> les déshydrogénases associées aux couples Red/Ox numéros 1 et 2, le cycle général d'oxydation du NADH et de réduction du NAD<sup>+</sup> est schématisé ci-dessous:



Enfin le couple NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> constitue la première étape de la chaîne mitochondriale que résume la réaction globale d'oxydo-réduction en aérobie:



Ce taux d'énergie libre, très élevé, est le moteur principal assurant la transformation de l'énergie sous forme d'ATP [Siesjö, 1978].

### III.B.2. Rappel du rôle du NAD(P)H

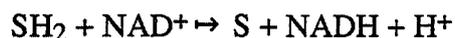
Les cellules vivantes sont d'une grande variété, mais toutes transforment l'énergie tirée de leur environnement en énergie chimique sous la forme du même composé: l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Ce composé transporte ensuite cette énergie jusqu'à son transfert sur d'autres molécules; ce transfert s'effectue par la perte d'un atome de Phosphore et de la liaison riche en énergie correspondante. Il en résulte la transformation de l'ATP en ADP (Adénosine DiPhosphate). A l'inverse, l'ADP peut être "rechargée" en retour par la fixation d'un atome de Phosphore. Dans une cellule animale la dégradation aérobie d'une molécule de glucose s'effectue en deux étapes:

- la première a lieu dans le cytosol (cytoplasme à l'exclusion des organites), sans consommation d'O<sub>2</sub>. Elle aboutit à la fourniture d'environ 5% de l'ATP total produit par la dégradation du glucose,
- la seconde se produit dans la mitochondrie (organite subcellulaire) et aboutit à la fourniture de 95% de l'ATP total. Cette dernière étape s'effectue au cours d'un processus appelé phosphorylation oxydative, durant lequel la consommation d'une molécule d'O<sub>2</sub> est liée à la production d'une molécule d'ATP.

A ce niveau, le couple Red/Ox NADH/NAD<sup>+</sup> constitue le lien entre la dégradation des substrats et la formation d'ATP dans la chaîne des transferts électroniques (Figure III-1). Ce lien s'exprime par deux composantes:

#### (1) Production de NADH.

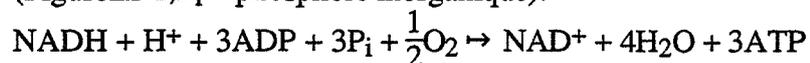
Le NADH est le coenzyme de la plupart des déshydrogénases; les principaux substrats sont le pyruvate, l'isocitrate, le malate et le α-KG (kéto-glutarate):



Le sens de la réaction peut se déduire du potentiel d'oxydoréduction

(2) Consommation de NADH.

L'équation globale de la chaîne respiratoire mitochondriale s'écrit (Figure III-1;  $\text{P}_i$  = phosphore inorganique):



L'état d'oxydo-réduction des mitochondries et des différents intermédiaires peut être comparé à un schéma hydraulique où le flux d'électrons du substrat à l'oxygène est semblable au flux de l'eau dans un ensemble de conduites, de robinets et de pompes [Siesjö, 1978]. La Figure III-1 montre, qu'à l'état d'équilibre entre le flux d'entrée et de sortie au travers de ce circuit, les niveaux d'oxydo-réduction doivent être constants; ces niveaux diminuent le long de la chaîne. Il est clair que suite à une déficience en oxygène, le niveau de réduction des différents transporteurs doit augmenter. De même si une déficience en substrat survient, ce même niveau chute. Une autre composante intervient dans le processus; elle concerne le niveau de production d'ADP et de  $\text{P}_i$ . Sur le schéma cette composante est figurée par des pompes intermédiaires.

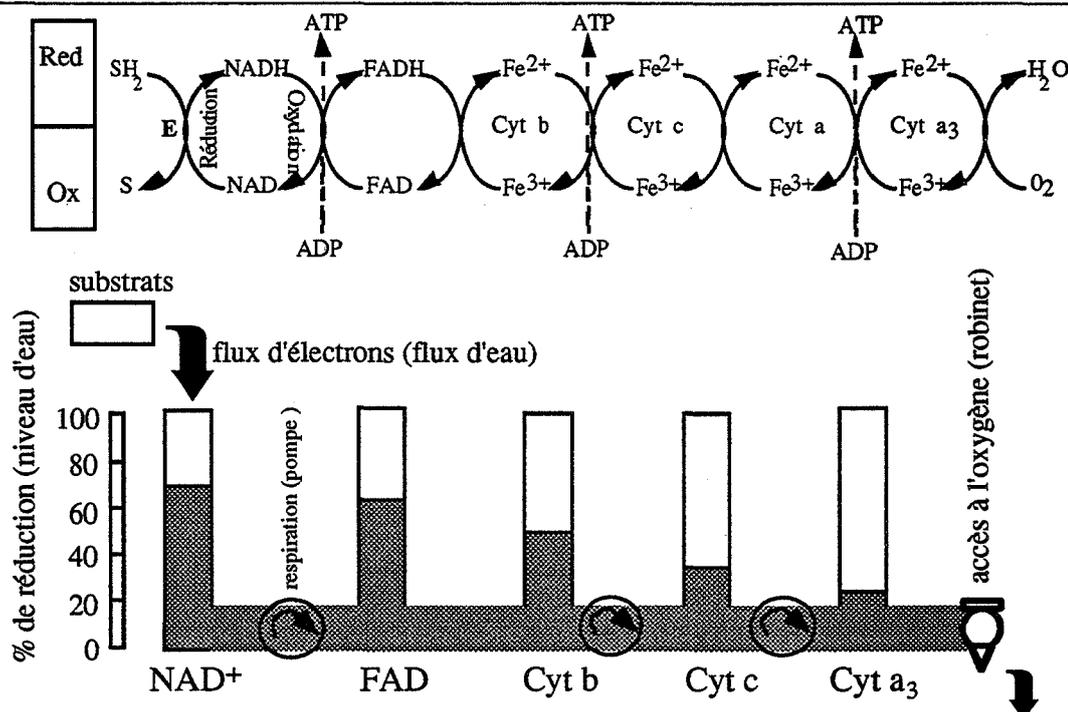
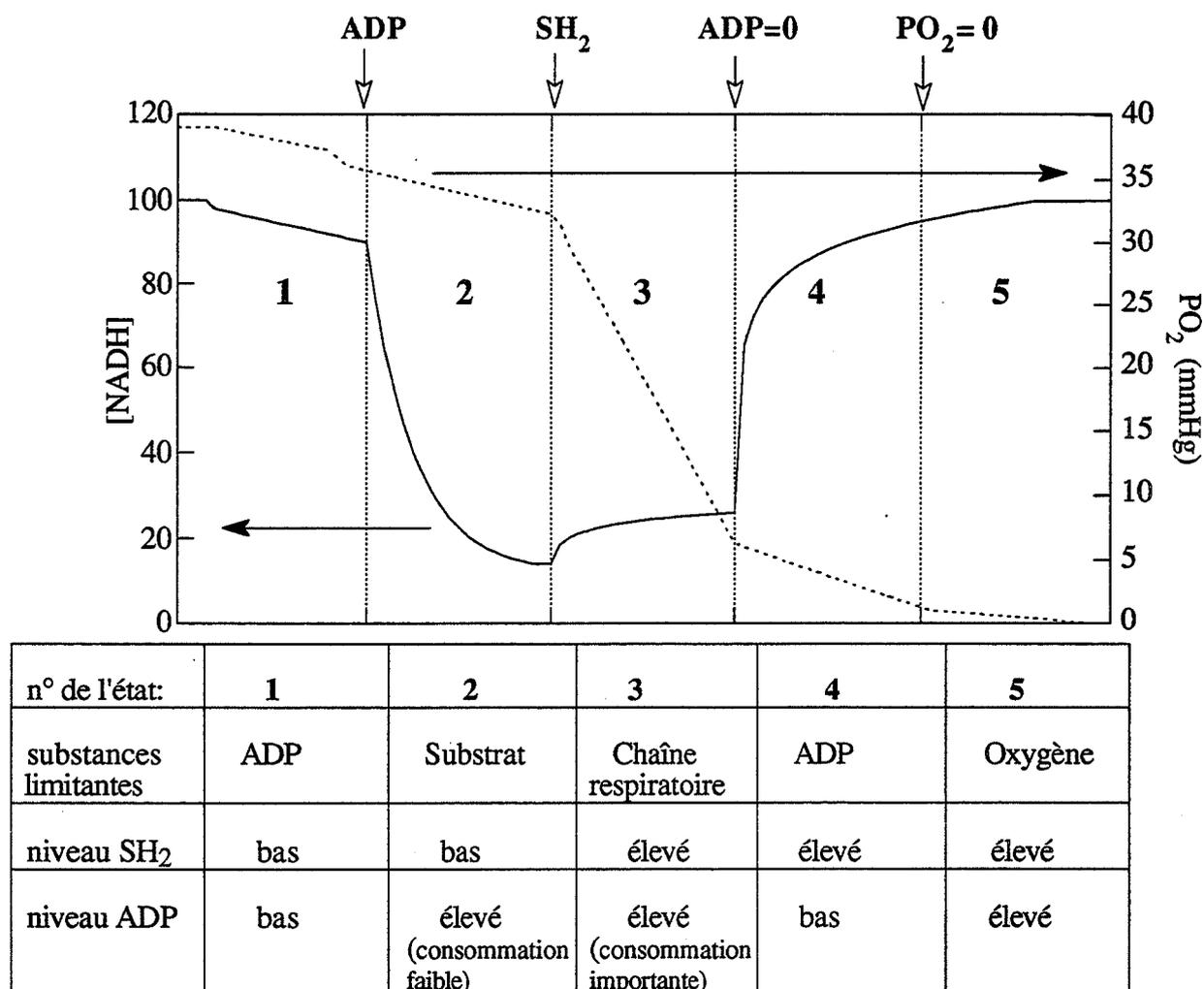


Figure III-1:

Schéma des transferts électroniques de la respiration mitochondriale et de l'analogie qu'ils présentent avec un système hydraulique [Siesjö, 1978] ( $\text{SH}_2/\text{S}$ : substrat, E: enzyme déshydrogénase associée aux substrats,  $\text{FADH}/\text{FAD}$ : flavine et  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ : l'hème des différents cytochromes)

L'état d'oxydo-réduction des mitochondries isolées, numéroté de 1 à 5 est décrit sur la Figure III-2 [Chance,1956], [Estabrook,1962]. Il correspond aux différents cas qui peuvent survenir *in vivo* suivant les niveaux de substrat, d'oxygène et de la respiration cellulaire (ADP, ATP). L'état physiologique normal (*in vivo*) se trouve entre l'état n°3 et 4 [Siesjö,1978].



**Figure III-2: Classification de la respiration mitochondriale**

Les correspondances entre les états déterminés *in vitro* et les situations *in vivo* peuvent être résumés ainsi [Siesjö,1978]:

- l'état 2 ressemble à l'hypoglycémie *in vivo*,
- l'état 5 est la situation en anaérobie.

On peut considérer  $[NADH] + [NAD^+] = C$  (C est une constante) pour un milieu cellulaire donné. L'évaluation de la variation du rapport  $R = \frac{[NADH]}{[NAD^+]}$

( par  $[NADH] = \frac{C R}{1+R}$  ) donne une information directe des changements de l'état d'oxydo-réduction cellulaire et indirectement de l'oxygénation tissulaire. Le

fonctionnement normal de la chaîne respiratoire mitochondriale de toute cellule vivante utilisant l'O<sub>2</sub> (aérobiose) nécessite des variations de ce rapport sur une gamme étendue mais excluant les conditions extrêmes. Quand le transport d'électrons dans la mitochondrie, et donc la formation d'ATP, sont arrêtés, l'équilibre est déplacé vers la réduction du NAD<sup>+</sup>, le NADH devient alors majoritaire. Ces conditions extrêmes peuvent survenir suite à:

- une anoxie prolongée (pas d'apport en O<sub>2</sub> à un organe, une cellule);
- une ischémie prolongée (pas d'apport en sang à un organe, ce qui entraîne rapidement une anoxie et une acidose);
- une intoxication de la chaîne respiratoire.

Toutes ces situations ont pour conséquences une élévation du niveau de NADH, pas de formation d'ATP et donc un danger immédiat pour la viabilité cellulaire. D'autres variations peuvent être envisagées comme celle du flux des substrats et de l'ADP (réalisable sur des organes perfusés *in vitro*).

D'autres événements peuvent déplacer l'équilibre NADH / NAD<sup>+</sup> vers l'oxydation du NADH, en particulier, la production de radicaux libres, par exemple, suite à une irradiation (rayonnement ionisant). Le NADH joue alors le rôle de protecteur contre les agents oxydants. Dans ces conditions le niveau de NADH chute.

Une meilleure connaissance des mécanismes de régulation du métabolisme intermédiaire est l'intérêt principal de l'étude de l'état d'oxydo-réduction du couple NAD(P)H / NAD(P)<sup>+</sup> *in vivo*.

### III.B.3. Distribution du NAD(P)H

Les coenzymes NAD(P)H sont universellement répandues dans la matière vivante avec une concentration plus importante dans le foie. En général, le couple NADH / NAD<sup>+</sup> domine le couple NADPH / NADP<sup>+</sup> (Tableau III-1). Le NAD<sup>+</sup> est prédominant par rapport au NADH, alors que pour l'autre couple, c'est la forme réduite qui est en quantité plus importante.

concentration en nmoles/(gr de tissu frais)	NADH	NAD <sup>+</sup>	NADPH	NADP
Foie du rat [Chance,1965a]	100	660	310	70
Cerveau du rat [MacIlwain,1959]		240		10
Cerveau du cochon (hémisphère) [MacIlwain,1959]		257		30

Tableau III-1:  
Concentrations tissulaires des NAD(P)(H)

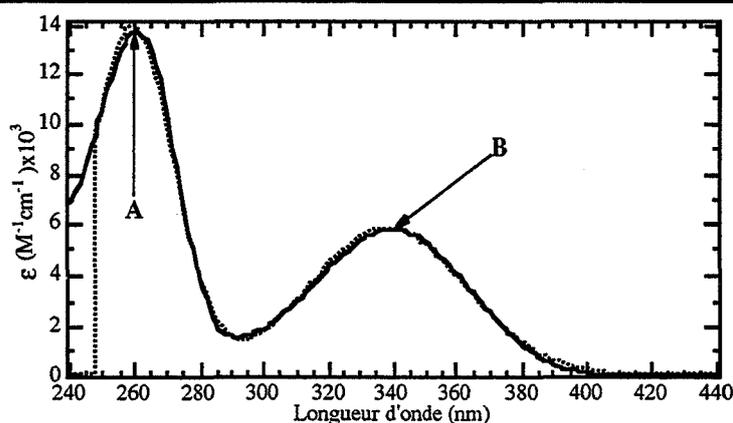
En outre les niveaux d'ATP et d'ADP qui interagissent avec le NAD(P)H / NAD(P) sont respectivement de l'ordre de 3 et 0.3  $\mu\text{mole/g}$  [Siesjö,1978]. L'administration de fortes doses de nicotinamide ou de nucléotides pyridiniques chez la souris, entraîne une faible augmentation de ces nucléotides au niveau cérébral [MacIlwain,1959]. Par contre la diminution enzymatique spécifique du  $\text{NAD}^+$  est très rapide. En estimant la concentration cérébrale de  $\text{NAD}^+$  à 400  $\mu\text{M}$ , le tissu cérébral peut désactiver le  $\text{NAD}^+$  (coupure de la partie nicotinamide) à des vitesses de 200  $\mu\text{moles/g/h}$  pouvant faire chuter de moitié la concentration en  $\text{NAD}^+$  en quelques secondes sur l'ensemble du tissu étudié [MacIlwain,1959]. Ces premiers travaux, sur le niveau des nucléotides réduits dans la matière vivante, font état de concentrations tissulaires assez élevées ( $\approx 0.3 \mu\text{moles/g}$  de tissu soit 0.2‰ massique) avec un net avantage pour le couple NADH / NAD plutôt qu'au couple NADPH / NADP (rapport molaire de 2 à 10).

### III.B.4. Propriétés photophysiques du NAD(P)H

#### III.B.4.a. Absorption

La Figure III-3 présente le spectre expérimental d'absorption du NADH dans le proche UV et l'ajustement (moindres carrés) par une somme de deux gaussiennes ( $a \cdot \exp(-((b-x)/c)^2)$ ):

	a ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	b (nm)	c (nm)
pic A	13960	260	17.8
pic B	5860	339	24.2



**Figure III-3:**

Facteur d'extinction moléculaire du NADH en solution tampon pH 7  
(la courbe en trait pointillé est un ajustement par une somme de deux gaussiennes)

Le pic B est presque centré sur la longueur d'onde du laser, le  $\epsilon$  n'ayant baissé que de 1.3% pour la longueur d'onde de 337 nm ( $\epsilon_{337}=5780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

En outre le spectre d'absorption du NADPH est semblable à celui du NADH. Il faut souligner que l'absorption du NAD(P)H est négligeable à partir de 400nm.

Le premier pic d'absorption de la forme oxydée se situe vers 260 nm. Le pic B est dû au noyau chromophore 1,4 dihydronicotinamide, la partie adénine n'absorbant pas à cette longueur d'onde mais seulement à 260 nm.

Pour des équivalents de concentration de NADH de 400  $\mu\text{M}$  en solution homogène, on obtient des densités optiques de 1 sur 4 mm à 337 nm; c'est à dire que 90% de la lumière laser est absorbée au bout de 4 mm.

#### III.B.4.b. Fluorescence

Le NAD(P)H contient deux fluorophores: la partie 1,4 dihydronicotinamide et l'adénine. Quand l'excitation concerne le pic B ou même le pic A (dans ce cas cette énergie est transmise à la partie nicotinamide et ce transfert est assez efficace (34%)) l'émission de fluorescence se déroule sur une bande assez large centrée sur 460 nm en milieu neutre [Wolfbeis,1985]. La fluorescence ne survient que lorsque la molécule est dans sa forme réduite, le NAD(P) n'étant pas fluorescent sauf en solution très basique. Quand le NAD(P)H est lié à des protéines enzymatiques, les maxima des longueurs d'onde d'excitation/d'émission peuvent changer considérablement: des valeurs extrêmes de 325/440 à 365/478 nm ont été rapportées [Wolfbeis,1985]. Certaines déshydrogénases peuvent entraîner une augmentation de la fluorescence du NAD(P)H d'un facteur deux. Le rendement quantique à 25°C se situe à 2% ce qui est relativement faible. Il augmente quand la polarité du solvant décroît [Gafni,1976].

#### III.B.4.c. FRT

Les temps de déclin de la fluorescence du NADH et du NADPH, en solution aqueuse, sont indiqués dans le Tableau III-2 [Visser,1981].

Les temps de déclin du NAD(P)H ont été mesurés comme résultant de la somme de deux exponentielles subnanosecondes dont le poids de la composante courte majoritaire augmente avec la température. L'hétérogénéité de l'émission a été interprétée en terme de mécanisme d'exciplexe intramoléculaire ("charge transfert excited state complex") et d'équilibre entre différents conformères, l'un étant à forme ouverte, l'autre à forme fermée avec les noyaux plans de la nicotinamide et de l'adénine parallèles entre eux et très proches [Visser,1981]. L'argument principal de cette analyse est le "comportement" photophysique très différent des mononucléotides (monoexponentiel et peu dépendant de la température) malgré des données spectrales assez semblables entre les mono- et les di-nucléotides (l'émission des mononucléotides est très légèrement déplacée vers le rouge).

De plus le rendement quantique des dinucléotides est deux fois supérieur à celui des mononucléotides [Visser,1981].

Le NAD(P)H, suivant qu'il soit libre, lié à une protéine enzymatique ou en complexe ternaire (lié à une enzyme en présence d'un substrat), présente des variations de temps de déclin importantes [Brochon,1976], [Gafni,1976], [Lakowicz,1992b].

corps	$\tau_1$ (ns)	$\alpha_1$	$\tau_2$ (ns)	$\alpha_2$
NADH <sup>a</sup>	0.25	0.82	0.69	0.18
NADPH <sup>a</sup>	0.31	0.86	0.70	0.14
NADH-LADH-Isobutyramide <sup>b</sup>	1.6	0.52	4.0	0.48
NADPH-GDH-Glutamate <sup>c</sup>	1.3	0.64	2.6	0.36

Tableau III-2:

Temps de déclin et coefficients préexponentiels de la fluorescence du NAD(P)H en solution neutre relevés dans la littérature:

<sup>a</sup>[Visser,1981]: 351/450nm à 20°C,

<sup>b</sup>[Gafni,1976]: 336/410nm à 34°C (LADH: liver alcohol deshydrogenase)

<sup>c</sup>[Brochon,1976]: 336/464nm à 30°C (GDH: glutamate deshydrogenase)

### III.B.5. La fluorescence du tissu cérébral

#### III.B.5.a. Historique

Les propriétés optiques et biochimiques du NAD(P)H ont été largement utilisées pour l'analyse, directe ou indirecte, de nombreuses réactions enzymatiques *in vitro*.

Une des méthodes d'estimation du rapport nucléotide réduit/oxydé est la mesure des concentrations tissulaires des couples en équilibre avec ces nucléotides. Cette méthode met en œuvre la mesure des couples  $\beta$ -Hydroxybutirate/Acetoacétate et Glutamate/ $\alpha$ -KG au niveau du foie ou celle d'autres couples comme le lactate / pyruvate. Elle souffre cependant de sérieuses limitations entraînant une faible fiabilité [Siesjö,1978]. Ainsi de nombreux auteurs se sont orientés vers la mesure directe du NAD(P)H *in vivo*.

Les premières mesures fluorimétriques *in vivo* ont commencé en 1956 par l'étude des mitochondries isolées [Chance,1956]. L'observation directe d'événements biochimiques intracellulaires (partie mitochondriale) et de leurs relations avec les fonctions physiologiques, présentent un intérêt indéniable. Grâce à ces travaux toute la terminologie liée aux états métaboliques des mitochondries a été mise en place (cf. partie précédente).

Les mêmes techniques ont été ensuite utilisées pour l'étude des muscles du squelette [Dubosc,1987], du foie [Chance,1965a], [Schnitger,1965], [Kobayashi,1971a], des reins [Kobayashi,1971b], du cœur [Chance,1965b], [Sugano,1974], [Oshino,1974], [Renault,1982], [Renault,1987] ainsi que du cerveau [Chance,1962], [Mayevsky,1974], [Mayevsky,1975], [Lewis,1975], [Harbig,1976], [Ji,1977], [Kramer,1979] [Mayevsky,1982], [Hoshi,1993]. Tout organe ayant une densité volumique élevée en mitochondries peut faire l'objet d'une étude par ce moyen analytique: cerveau, cœur (tissu contractile) [Renault,1984], rein, foie, thyroïde... Sous excitation UV la fluorescence bleue émise par les organes étudiés provient en grande partie des nucléotides réduits.

#### III.B.5.b. Fluorimétrie *in vivo* de tissu cérébral

Les études par fluorimétrie sans FO du cerveau de rat anesthésié (équipes de Chance, de Jobsis) sont limitées à des mesures en surface (taille millimétrique), possibles après une simple craniectomie et avec la dure-mère et la pie-mère laissées, soit intactes, soit incisées. Les buts de ces approches sont focalisés sur l'étude des mécanismes d'oxydo-réduction de l'oxygène (normoxie ( $pO_2$  normale), hypoxie ( $pO_2$  faible), anoxie ( $pO_2=0$ ), effet d'oxygène hyperbare ( $pO_2$  élevée)) [Chance,1962], [Mayevsky,1974], [Mayevsky,1975], [Harbig,1976], [Ji,1977], [Kramer,1979], [Mayevsky,1982].

Ils sont aussi orientés sur des substrats comme:

- le glucose (hypoglycémie sévère induite par insuline, coma), [Bryan,1983], [Bryan,1986], [Uematsu,1989],
- les ions  $K^+$  [Lewis,1975], [Mayevsky,1982],

—et les anesthésiques [Chance,1962], [Nowicki,1987].

D'autres approches s'intéressent à la fluorescence intrinsèque du tissu cérébral notamment pour adapter des traitements médicaux en cancérologie (diagnostic, identification par photosensibilisation et photothérapie) [Andersson,1987]. La fluorescence bleue émise sous excitation UV est alors considérée comme une gêne ou comme un facteur de bruit couvrant la fluorescence de photosensibilisateurs comme l'hématoporphyrine.

Les spectres d'émission enregistrés sur des tranches de tissu cérébral ou sur les organes intacts [Chance,1962], [Harbig,1976], sont assez proches de ceux obtenus avec les nucléotides *in vitro*. L'analyse biochimique des variations des nucléotides est en corrélation étroite avec les mesures de fluorescence [Chance,1962]. Dans des tissus métaboliquement très actifs comme le cerveau, l'état du métabolisme des nucléotides serait comparable à l'état mitochondrial n° 3 proche de l'état n°4, c'est-à-dire que le niveau d'oxygène intracellulaire serait assez faible [Chance,1962]. Les données sur la fluorimétrie de tranches tissulaires perfusées ont montré que la mesure s'effectuait sur une profondeur inférieure à 500µm sous excitation à 366nm [Chance,1962]. L'excitation à 337 nm diminue encore cette épaisseur d'interaction tissu-lumière.

Malgré le fait que la spécificité biochimique (nucléotide réduit) de la fluorescence du cerveau *in vivo* soit bien établie, il est connu que certains facteurs mécaniques (mouvement) et physiologiques peuvent modifier le signal de fluorescence mesuré *in vivo*. Dans la littérature deux sources d'erreurs dans l'affectation des variations de l'intensité d'émission de fluorescence liées aux seules variations du NADH sont reportées, elles peuvent être liées:

- aux artefacts mécaniques dus aux mouvements respiratoires et aux pulsations cardiaques...
- aux changements de l'absorption et de la réflexion du tissu (artefacts oximétriques survenant lors de changements du niveau d'oxygénation; artefacts hémodynamiques liés aux modifications du volume sanguin du tissu analysé).

#### III.B.5.b.i. Effets des modifications de l'oxygénation du tissu analysé

La différence entre les spectres d'absorption de l'oxy-hémoglobine et de la desoxy-hémoglobine (surtout dans la zone 350-450nm) peut entraîner une modification sensible de l'absorption de la lumière excitatrice et de celle émise par le NAD(P)H. Chance et coll. se sont appuyés sur les résultats spectroscopiques obtenus avec des tranches de tissu cérébral, perfusées ou non pour n'attribuer à cet effet qu'un rôle négligeable

[*Chance,1962*]. Par contre, certains auteurs ont montré l'importance de cet effet sur le niveau de la fluorescence pendant une anoxie [*Kramer,1979*].

#### III.B.5.b.ii. Effets des modifications du flot sanguin du tissu analysé

Sur les organes comme le foie, le rein ou le cœur, plusieurs auteurs ont montré que les variations de la circulation sanguine intra-tissulaire perturbaient de manière significative l'intensité du signal d'émission par rapport aux modèles expérimentaux utilisant des organes perfusés avec des solutions biologiques sans globules rouges, [*Chance,1962*], [*Schnitger,1965*], [*Kobayashi,1971a*], [*Kobayashi,1971b*]. La perturbation principale appelée "artefact hémodynamique", a pour origine la modification de la diffusion de la lumière (aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission) en fonction des changements du volume sanguin de la zone analysée. L'augmentation apparente de l'intensité d'émission et de la lumière réfléchie de l'organe perfusé, résulte d'une baisse de la diffusion lumineuse. Cette diminution de la diffusion est due au plus faible nombre de globules présents.

Pour le tissu cérébral, une baisse apparente de l'émission de fluorescence de 23% a été mesurée entre des couches de tissu perfusées sans globules rouges et des couches intactes; les couches perfusées en général émettent plus [*Chance,1962*]. Cette variation est moitié moins importante que celle enregistrée dans les mêmes conditions pour le tissu rénal [*Chance,1962*]. Elle est six fois moindre que les résultats sur le rein de Kobayashi; cependant la comparaison quantitative suscite une réserve liée aux conditions expérimentales différentes [*Kobayashi,1971a*], [*Kobayashi,1971b*].

#### III.B.5.b.iii. Les modalités de correction

Beaucoup d'auteurs suggèrent que la modification principale du signal de fluorescence (autre que les variations moléculaires du NADH) est celle générée par les variations du volume sanguin de la zone analysée [*Kobayashi,1971a*]. Les effets des modifications spectrales des pigments sanguins (hémoglobine), mitochondriaux (cytochromes, flavine) sur la fluorescence du NAD(P)H sont bien plus faibles [*Chance,1962*], [*Kobayashi,1971a*], [*Mayevsky,1982*]. L'approche dominante de ce problème consiste à corriger le signal brut de fluorescence. Généralement la correction est égale au signal de fluorescence mesuré à une longueur d'onde  $\lambda$  choisie (point isobestique c'est-à-dire la longueur d'onde où les formes des pigments présentent la même extinction moléculaire) divisé par la mesure de la réflexion (effectué à la longueur d'onde de la raie du Mercure utilisée, 366nm) [*Harbig,1976*]. Pour des organes comme le cœur, le rein et le foie, d'autres facteurs correctifs sont proposés mais nécessitent une autre source lumineuse et une mesure de réflectance dans le rouge ou le proche IR 720-805nm [*Kobayashi,1971a*], [*Renault,1982*]. Cependant une autre école s'est formée pour tenir compte plus précisément des possibles artefacts oxymétriques: la fluorimétrie isobestique

[Kramer,1979]. Selon cette technique les longueurs d'onde d'émission sont choisies là où les hémoglobines oxygénées et désoxygénées présentent la même extinction moléculaire (448nm, 549nm et 586nm). Le rapport de la fluorescence mesurée à 448nm par la fluorescence enregistrée à 549nm est alors considéré comme dénué des artefacts oxymétriques et hémodynamiques [Kramer,1979].

Les artefacts liés aux problèmes mécaniques sont les plus faciles à résoudre. L'utilisation de FO a permis un meilleur contrôle mécanique entre l'appareil de mesure et le tissu étudié.

### III.B.5.c. Mesure cérébrale *in vivo* du NAD(P)H avec des FO

Les travaux en fluorimétrie de surface d'organe à des fins de mesure de NAD(P)H ont commencé dès la fin des années cinquante et se sont poursuivis jusqu'au milieu des années soixante dix où les fibres optiques ont commencé à être utilisées pour la mesure *in situ* et *in vivo* [Weiss,1978]. L'apparition des fibres optiques a permis l'extension de ces méthodes à des mesures dans des tissus profonds ou sur des surfaces contrôlées et plus réduites. Les travaux de mesure cérébrale par FO de Chance et Mayevsky [Mayevsky,1982] sont à souligner. Dernièrement la fluorimétrie vidéo *in vivo* du NAD(P)H a permis d'analyser sur une zone millimétrique, les variations de l'état d'oxydo-réduction intra-mitochondrial ainsi que la demande en oxygène [Alcock,1992]. Une des limites des mesures par FO est liée à l'hétérogénéité du tissu analysé [Ji,1977], [Alcock,1992].

### III.B.5.d. Conclusions

Dans l'ensemble, les études de la fluorescence émise par les tissus cérébraux rencontrent trois limites :

- conceptuelle,
- anatomique,
- et instrumentale.

Notre approche capteur chimique met en lumière les limites conceptuelles des équipes qui ont abordées le domaine de la mesure de la fluorescence du tissu cérébral *in vivo*. Leurs choix thématiques sont confinés sur l'étude du métabolisme énergétique cérébral.

Les modalités des corrections hémodynamiques et oxymétriques et même leurs nécessités dépendent étroitement des choix anatomiques, thématiques et instrumentaux des différents auteurs. Le choix anatomique de mesure sur la surface sur la dure-mère entraîne une sensibilité non négligeable aux variations du flux sanguin périphérique. Les choix thématiques concernant l'oxygénation tissulaire, l'état d'oxydo-réduction mitochondrial du tissu cérébral nécessitent des corrections des artefacts oxymétriques.

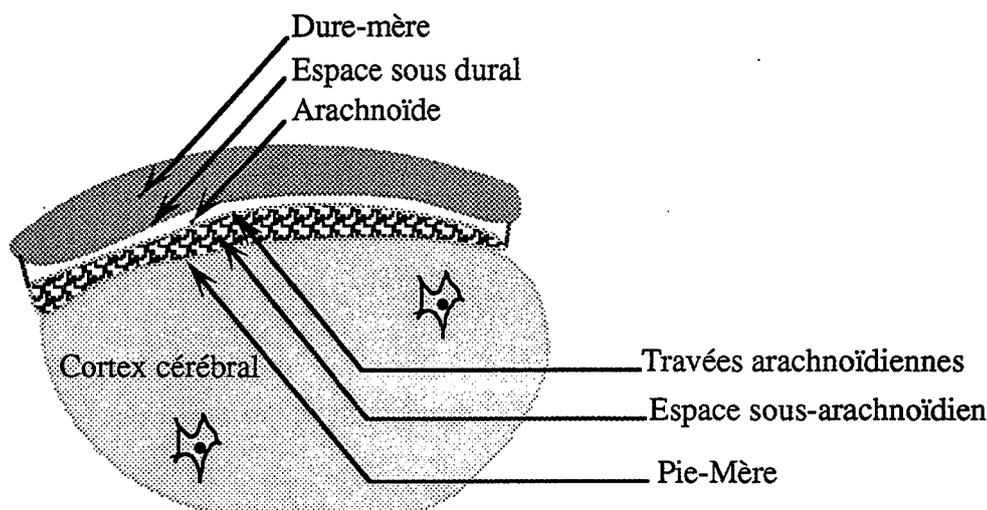
**Figure III-4:**

Schéma de l'anatomie de la coupe de zone cérébrale au voisinage de sa périphérie

Les choix anatomiques des lieux de mesure *in vivo* sont restreints aux domaines allant des tranches tissulaires cérébrales maintenues en vie jusqu'à la mesure de la surface du cerveau. Pour ces mesures la dure-mère et la pie-mère étant laissées intactes ou incisées sur des animaux en général anesthésiés et ventilés (Figure III-4).

Les choix instrumentaux des recherches sur le cerveau sans FO et même avec FO ont entraîné des résolutions anatomiques millimétriques et le maintien d'une distance entre le capteur et le tissu [Mayevsky,1975], [Mayevsky,1982].

En outre il apparaît que la fluorimétrie tissulaire décrite au départ par Chance [Chance,1962] n'est pas mise en œuvre avec un seul type d'instrumentation mais par une famille de systèmes distincts, tous fondés sur les mêmes propriétés photophysiques tissulaires. Chaque système reflète les compromis élaborés face aux choix techniques [Kramer,1979].

Nous n'avons pas relevé dans la littérature de recherches sur les tissus profonds cérébraux, ni de travaux sur la réalisation d'un microcapteur (zone de mesure submillimétrique) ou d'une prothèse cérébrale éliminant toute distance appareil-tissu. A la vue des diverses approches ainsi que de leurs limites et persuadés que le potentiel de mesure fluorimétrique *in vivo* n'a été qu'effleuré, nous avons choisi de développer un prototype d'une autre génération permettant une nouvelle approche du microcapteur. En particulier nous avons souhaité atteindre une résolution anatomique submillimétrique (diamètre de 200 $\mu$ m) afin de réaliser des mesures sur des groupes cellulaires assez petits (nRD) et de pouvoir atteindre toutes les zones cérébrales (superficielle ou profonde) dans des conditions physiologiques non traumatisantes (rat non anesthésié et libre de tous mouvements).

En outre cette nouvelle génération de FOCS bénéficie des avancées instrumentales, de la photonique (sources laser, fibres optiques, composants opto-électroniques (PM, photodiode rapide)), de l'électronique (digitaliseur rapide) et de l'informatique (acquisition et traitement du signal).

### III.C. Le FOCS implanté chez le rongeur en conditions chroniques

#### III.C.1. Intérêt premier: étude chimique pendant les diverses phases de la vigilance

Quels sont les processus et les modifications du métabolisme cérébral pendant diverses phases de la vigilance? Cette question demande des techniques exploratoires nouvelles, car il faut constater le peu de données bibliographiques sur les variations du métabolisme oxydatif cérébral pendant les états d'éveil et de sommeil [Siesjö,1978].

Le FOCS développé permet l'étude des variations du métabolisme cérébral survenant suivant l'état de vigilance dans un volume défini de tissu.

Malgré les enjeux biologiques et médicaux liés à la compréhension des mécanismes moléculaires de la vigilance, il est remarquable de constater que ce domaine ouvre au chercheur un champ d'investigation quasiment vierge. Cet état de la recherche est lié à trois freins essentiels:

- biologique: le modèle des rongeurs malgré la facilité de manipulation qu'il offre, pose de sérieuses limites en l'occurrence la faible durée des phases de PS (1 à 2 min en moyenne). Cet aspect serait plus favorable chez le chat chez qui les phases de PS peuvent durer plus longtemps. Pour des raisons notamment "de coût", nous n'avons pas encore adapté notre technique ni au chat, ni au primate.
- nécessaire approche multidisciplinaire: physique, chimique et biologique.
- difficultés techniques liées à la conception et à la réalisation d'un appareillage permettant une mesure biochimique, rapide, sensible et sélective chez l'animal libre en conditions chroniques également équipé avec les électrodes nécessaires à la détection polygraphique des états de vigilance.

### III.C.1.a. Introduction

Dès les années 30, les enregistrements électroencéphalographiques ont révélé l'existence d'une différence importante entre l'activité électrique de l'éveil et du sommeil. Mais ce n'est qu'à partir des années 50, qu'un troisième état du fonctionnement cérébral apparaissant pendant le sommeil, fut découvert. Cet état caractérisé par des périodes d'atonie musculaire totale, associées à une désynchronisation corticale, semblable à celle de l'éveil, fut dénommé sommeil paradoxal (PS) [Jouvet,1959].

Ainsi chez les mammifères, les approches polygraphiques et comportementales ont aboutit à la distinction de trois états de vigilance, l'éveil (W), le sommeil à ondes lentes (SWS) et le sommeil paradoxal (PS), le PS étant considéré comme le corrélât neurophysiologique du rêve. Les descriptions phénoménologiques de ces états amenèrent inévitablement les questions relatives à leurs mécanismes biologiques. L'activité particulière et intense du cerveau pendant le PS suggère l'existence de facteurs endogènes nécessaires pour son maintien. Le développement de la neurochimie a dégagé diverses classes de composés chimiques impliqués dans les mécanismes d'alternance ou de maintien des états de sommeil (neuromédiateurs, molécules facteurs hypnogènes...). Les difficultés de l'analyse post-mortem orientèrent très vite les recherches vers les capteurs chimiques ou les moyens permettant une mesure *in vivo*. Nous avons déjà vu dans le chapitre "mesure *in vitro* de la sérotonine", l'intérêt de la mesure de la 5-HT. Les deux outils actuellement utilisés à cet effet sont la voltamétrie et la dialyse intracrânienne. La mesure de la 5-HT *in vitro* avec un capteur chimique extrinsèque à fibre optique a constitué la première étape de faisabilité de notre approche.

Après un court rappel sur les états de vigilance, nous allons aborder dans la suite de ce chapitre:

- les moyens développés pour la mesure *in vivo*,
- les résultats obtenus,
- les perspectives.

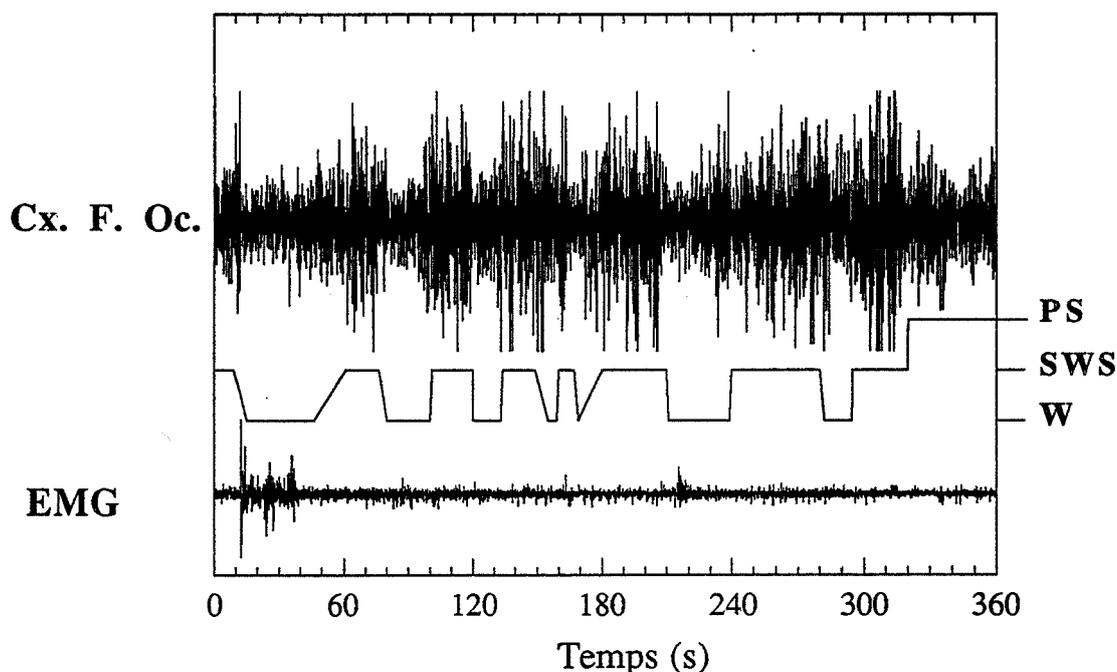
### III.C.1.b. Rappels sur les états de vigilance

Nous venons de voir que chez les mammifères, trois états de vigilance ont été identifiés (W, SWS, PS). Pour certaines espèces il est possible de subdiviser le SWS en différents stades correspondant à un sommeil "de plus en plus profond"; par exemple chez le chat les stades I et II ou chez l'homme les stades I à IV. Chez le rat seuls deux stades de sommeil, lent et paradoxal, sont habituellement distingués, bien que diverses subdivisions aient été proposées [Gottesmann,1971].

Sur la Figure III-5 nous avons reporté les deux paramètres représentant l'activité électrique du cortex et des muscles de la nuque. Les états de vigilance sont identifiés suivant les critères suivants:

- L'éveil (W). Du point de vue comportemental, l'animal présente un tonus postural important. Il est généralement actif et réagit aux stimulations extérieures. Le signal électrique cortical est constitué de fréquences rapides et de bas voltage avec une activité thêta régulière (5 à 7 Hz). Les muscles de la nuque présentent une activité électromyographique importante (Figure III-5).
- Le sommeil lent (SWS). L'animal est roulé en boule et le tonus musculaire reste faible. La respiration est calme et régulière. Le rythme cardiaque est ralenti. L'activité électrique corticale est constituée de fuseaux (13 à 16 Hz) de haut voltage associés à des ondes lentes (2 à 3 Hz) (Figure III-5). Le signal électromyographique est diminué par rapport à l'éveil et il n'y a pas de mouvements oculaires.
- Le sommeil paradoxal (PS). Cet état est caractérisé par une atonie musculaire totale et des phénomènes phasiques comme des mouvements saccadés des oreilles et des extrémités des pattes. La respiration et le rythme cardiaque sont irréguliers. L'activité électrique corticale ressemble à celle de l'éveil; le rythme thêta est bien marqué, la fréquence de ce rythme augmente en présence de mouvements oculaires rapides. Le signal électromyographique est nul (Figure III-5).

Plusieurs alternances entre l'état W et l'état SWS sont reportées sur la Figure III-5 avec une échelle des temps de 6 min.



**Figure III-5:** Les états de vigilance du rat  
(Cx. F. Oc.: électrocorticogramme fronto-occipital;  
EMG: électromyogramme des muscles de la nuque).

### III.C.2. Matériel et Méthode

#### III.C.2.a. Méthode de mesure par FO

Nous avons vu dans la partie "Rappels sur la fluorimétrie cérébrale *in vivo*" que la microfluorimétrie tissulaire a été mise en œuvre à travers une famille de systèmes distincts, dont chacun est un compromis face aux choix techniques. Pour notre part et pour cette partie *in vivo* nous n'avons pas introduit de facteur correctif. De ce fait les méthodes de mesure et de traitement du signal restent identiques à celle de la partie "mesure *in vitro*".

#### III.C.2.b. Matériel utilisé pour la mesure par FO

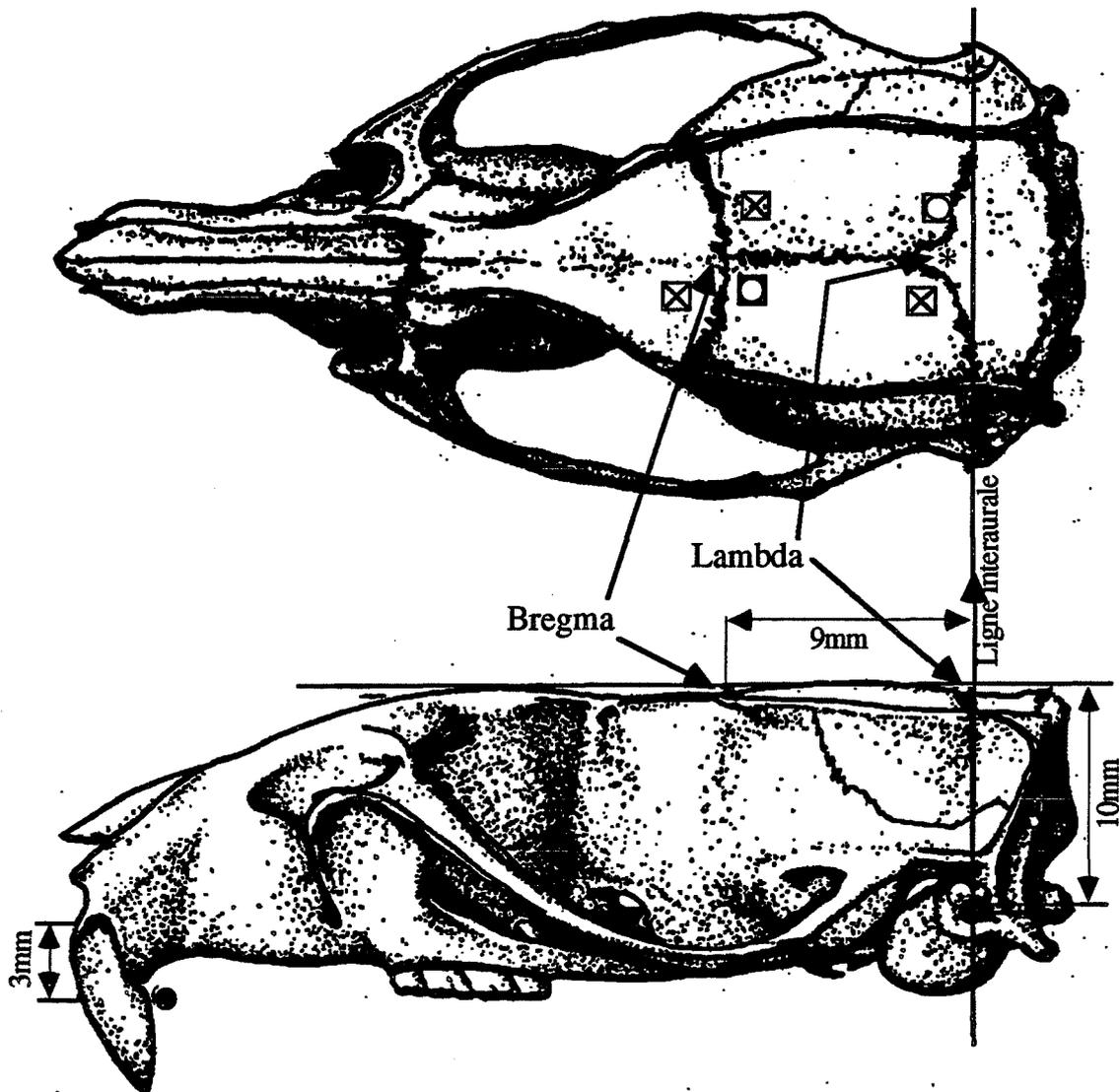
Le seul changement notable par rapport au montage utilisé précédemment concerne la FO. La fibre optique utilisée n'est plus le modèle PCS 1000 avec un diamètre de cœur de 1mm mais le modèle PCS 200A de Quartz et Silice (6 à 12 m, Ø extérieur de 600 µm, Ø cœur+cladding 380 µm, cœur 200 µm, l'ON de 0.4.)

#### III.C.2.c. Réalisation de la prothèse cérébrale

Nous avons utilisé 18 rats mâles OFA (200-300 g IFFA CREDO). Les canules guides sont d'abord positionnées sous anesthésie générale au chloral hydrat (400 mg/Kg) dans le cortex et le nRD après craniectomie [Paxinos, 1983]. Ces canules guides ( $\text{Ø}_{\text{ext}}=0.6$  mm) de longueur variable suivant la zone explorée (13 mm pour le nRD) sont implantées stéréotaxiquement 2 mm au dessus de la structure cible (nRD) avec une angulation dans le plan sagittal de 28°. Pour le cortex, celles ci sont fixées à la position: Bregma=-0.26 mm, Latéral=2 mm et Vertical: 0.5 mm). Elles sont ensuite fixées à l'os du crâne par du ciment dentaire, un mandrin de même taille que la FO est laissé à demeure entre les sessions de mesure. Pour les mesures polygraphiques, les activités électriques, corticale et musculaire, sont enregistrées. Pour les mesures de l'activité électrique corticale, 4 électrodes, constituées de vis en inox reliées à un fil souple sont placées au contact de la dure-mère; 2 de ces électrodes sont placées un millimètre en arrière de la suture bregma et deux autres un millimètre en avant de la suture lambda (Figure III-6). Les électrodes destinées à mesurer l'activité électrique des muscles de la nuque sont constituées d'un fil d'acier gainé de plastique dénudé sur cinq millimètres aux 2 extrémités. Ces électrodes sont insérées entre deux plans musculaires. Toutes les électrodes sont ensuite reliées à un connecteur miniature et rendues solidaires du crâne avec les canules, par du ciment dentaire (IVOCLAR). Les tracés polygraphiques sont analysés visuellement par période de 30 secondes.

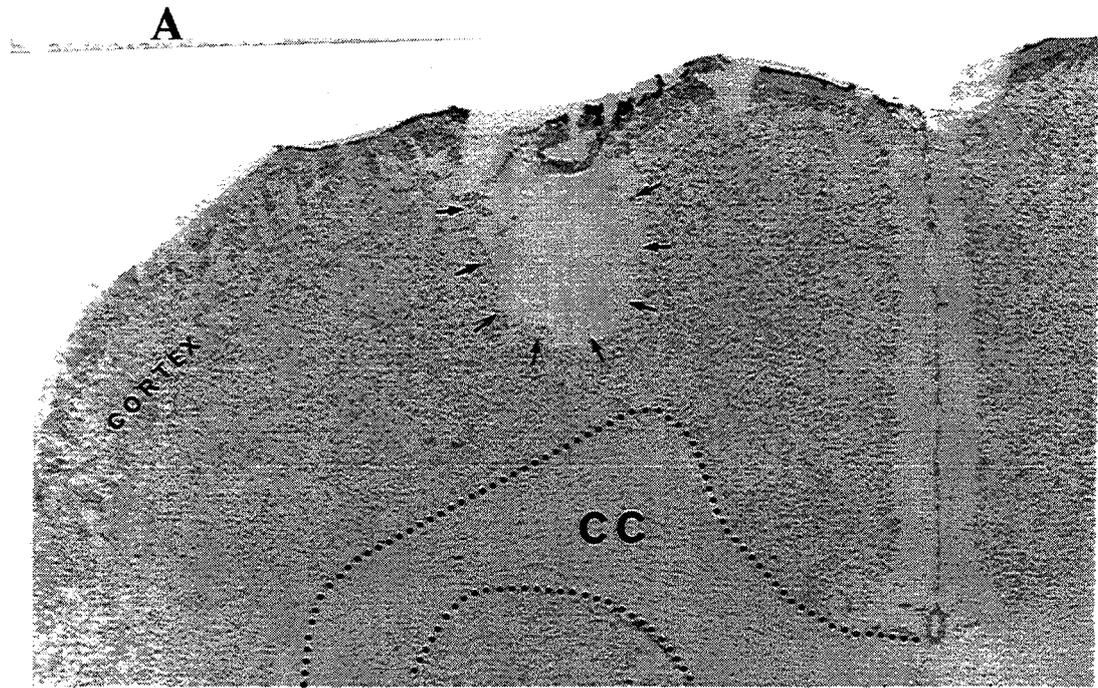
Les animaux sont ensuite laissés en récupération post-chirurgicale pour une période de dix jours. Des séries de mesure avec la FO sont réalisées sur un mois environ. Les animaux sont soumis à des cycles lumière-obscurité de 12h-12h à une température

constante de 24°C avec de la nourriture et de l'eau ad libitum. Au bout de cette période, une lésion électrolytique du site de mesure est effectuée sous anesthésie générale. Pour cela la FO est retirée et remplacée par une électrode en Tungstène de même dimension. Le passage d'un courant de 1 mA pendant 4 s à travers elle, permet de repérer précisément l'extrémité de la FO. Le cerveau est ensuite prélevé et congelé à -20°C. Le contrôle histologique est effectué sur des tranches cérébrales de 20µm colorées au Crésyl violet (Figure III-7).

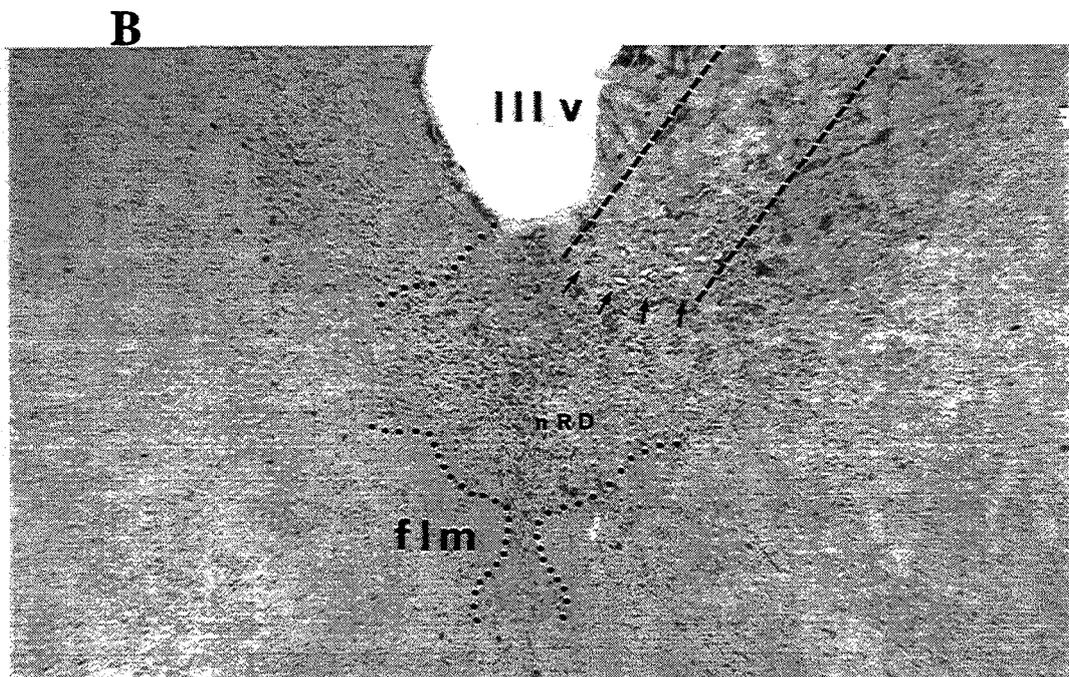


**Figure III-6:**

Position des électrodes et des canules sur les Vues Dorsale et latérale du crâne d'un rat. (Les positions du bregma, du lambda et du plan de la ligne interaurale sont indiquées. La distance entre le plan horizontal passant par le bregma et le lambda et le plan horizontal passant au travers de la ligne interaurale est indiquée sur la droite de la vue latérale. La position des électrodes est marquée par  $\boxtimes$ . La position des canules d'accès au nRD et au Cx est représentée respectivement par les signes  $\boxdot$  et  $\square$ ).



Les flèches indiquent la position de la lésion au niveau du Cx. CC = corps calleux. Les pointillés indiquent la limite des CC. Plan frontal Interaural 9.7 [Paxinos,1983].



Les tirets marquent le passage du corps de la FO, les flèches indiquent la position de son extrémité. FLM = fasciculus longitudinal médian. Les pointillés signalent la limite du nRD. Plan Interaural 1.00 [Paxinos,1983].

**Figure III-7:**  
Positions du FOCS au niveau du Cx (A) et du nRD (B)

### III.C.3. Analyse des propriétés photophysiques du tissu cérébral

#### III.C.3.a. Introduction

##### III.C.3.a.i. Passage du milieu aqueux *in vitro* au milieu tissulaire *in vivo*

Après la mesure chimique *in vitro*, et après avoir souligné l'intérêt des mesures *in vivo* nous abordons ici les modalités des mesures *in vivo*. La différence majeure par rapport aux mesures *in vitro* est liée à la nature du milieu où elle s'effectue.

Le FOCS extrinsèque développé, permet une interaction volumique entre la matière et la lumière par opposition aux mesures surfaciques réalisées par des méthodes de voltamétrie (surface de l'électrode) ou de dialyse intracrânienne (surface de la membrane de dialyse).

Les données bibliographiques relatives aux propriétés de fluorescence des tranches de tissu cérébral, indiquent que l'épaisseur de pénétration du signal d'excitation (situé dans le proche UV) est au maximum de 500 $\mu\text{m}$  [Chance,1962]. L'utilisation de FO ( $\varnothing = 200\mu\text{m}$  et excitation à 337nm) permet de réaliser des mesures dans un volume inférieur à 0.063 $\mu\text{l}$ . Le nombre d'éléments cellulaires par  $\mu\text{l}$ , dans le cortex du chat est de l'ordre de 23900 pour les neurones, de 18300 pour les astrocytes et 23200 pour les oligodendrocytes [Siesjö,1978]. Dans le volume maximum exploré, il y a environ 1500 neurones, 1100 astrocytes et 1400 oligodendrocytes. Il faut aussi tenir compte des érythrocytes du volume sanguin qui irrigue le tissu analysé, dont les pigments, oxyhémoglobine et desoxyhémoglobine, sont à la base de la couleur rose du tissu cérébral. L'ensemble de ces éléments baigne dans le LCR. Malgré la complexité du milieu, il apparaît que les niveaux de fluorescence mesurés au niveau du nRD et du cortex sont comparables entre divers animaux, le cortex étant toujours moins fluorescent que le nRD.

En outre, la motricité de l'animal n'étant pas restreinte, la fibre est aussi soumise à des torsions et à des déplacements mécaniques. Ceux-ci n'entraînent cependant que peu de modifications du signal, sauf dans les cas où les torsions sont très prononcées (entortillement prononcé accidentel). Il s'est avéré nécessaire de palier à cet inconvénient par une platine en rotation placée sous la cage de l'animal.

##### III.C.3.a.ii. Invasivité de la mesure

Dans les deux structures explorées, Cx et nRD, aucun trouble du comportement n'a été observé pendant l'excitation du laser de la zone tissulaire cible. Cependant il est toujours périlleux de parler de mesure non invasive, car les effets du laser et des phénomènes photophysiques (principalement thermique) et photochimiques (en

particulier des photolyses) sur le tissu cérébral existent [ShenZeng,1982]. En effet le travail de ShenZeng et coll. [ShenZeng,1982] dans le cortex frontal et le tissu striatal (caudate nucleus) du rat, sous illumination d'un laser azote a montré l'existence de certaines variations des composés étudiés catécholamines (dopamine, norepinephrine), les composés 5-hydroxyindoliques (5-HT, 5-HIAA) et acides aminés contenant des résidus aromatiques (acide aspartique, glutamique et  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA)). Des diminutions de la dopamine (10%) et de la 5-HT (38%), ainsi que des élévations du 5-HIAA (32%) et de l'acide aspartique (10%) ont été mesurées. Au niveau du couple 5-HT / 5-HIAA, pour les deux zones, Cx et caudate nucleus, le même effet a été observé avec des pourcentages semblables. Dans les mêmes conditions l'illumination d'un He-Ne ( $\lambda=632.8\text{nm}$ ) a entraîné une diminution de la 5-HT et du 5-HIAA de l'ordre de 60 % dans les 2 structures. L'effet de photolyse moléculaire est à rejeter à la vue de l'absence d'effet de ces deux lasers sur les concentrations de 5-HT et 5-HIAA *in vitro*. Ces deux radiations l'une dans l'UV et l'autre dans le rouge semblent toucher certains processus métaboliques sérotoninergiques. Ces variations de concentration sont limitées aux variations des quantités tissulaires globales rapportées au poids du tissu frais. Aucun élément ne permet de prévoir le compartiment initialement affecté.

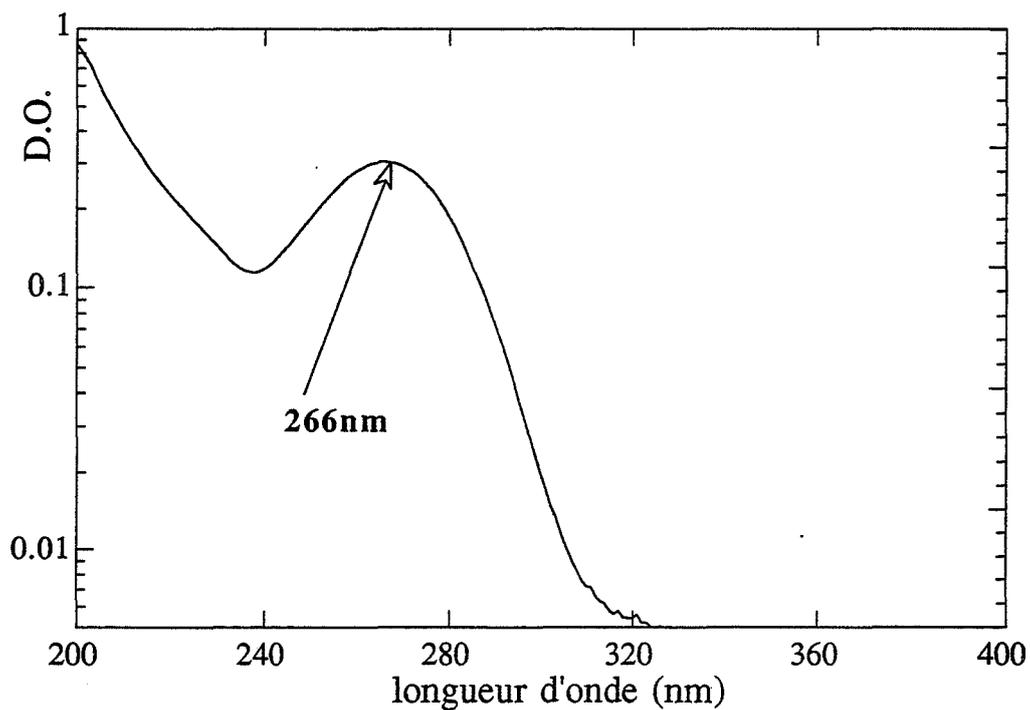
### III.C.3.b. Propriétés photophysiques du LCR

En premier lieu, nous nous sommes intéressés aux propriétés d'absorption et de fluorescence du LCR pour déterminer son importance relative par rapport à l'absorption du laser et par rapport au signal mesuré. Nous étudierons ensuite l'autofluorescence de 2 structures, cortex et nRD, en vue d'identifier les composés endogènes fluorescents. L'identification la plus assurée est celle de l'émission à 460 nm sous excitation à 337 nm, qui peut être attribuée à la présence du NAD(P)H endogène.

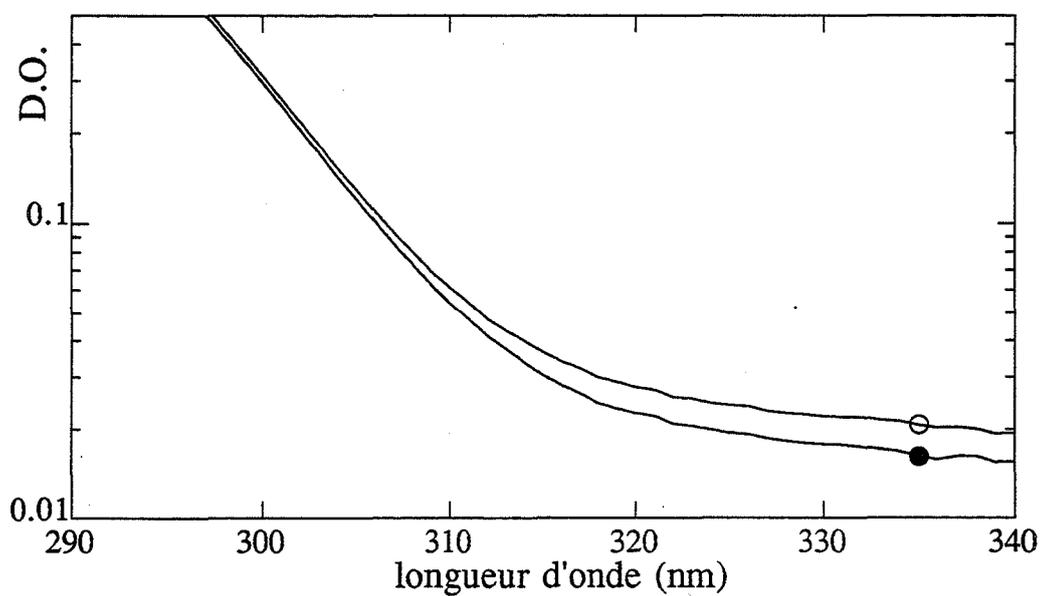
Le prélèvement du LCR a été effectué sur cinq rats (pour l'absorption) et sur six rats (pour la fluorescence) au niveau de la *cisterna magna*. Seuls les prélèvements ne présentant aucune trace de sang ont été évalués.

#### III.C.3.b.i. Absorption UV-Vis du LCR

Le spectre d'absorption du LCR juste prélevé, dilué ou non, a été mesuré par pas de 1nm dans le domaine 200-470 nm (Figure III-8 et Figure III-9). Sur la Figure III-8, le spectre d'absorption moyen (n=5) du LCR dilué à 1/20, présente un pic centré à 266 nm. Sur du LCR non dilué, il y aurait 90% d'absorption de la lumière à 266 nm après 33  $\mu\text{m}$ . L'origine moléculaire de cette absorption peut être attribuée aux protéines du LCR, en premier lieu à l'albumine. Celle-ci est présente en quantité supérieure aux autres (plus de 50% de l'ensemble des protéines) à une concentration de 0.2 g/l (3  $\mu\text{M}$ ), et est semblable à celle trouvée dans le plasma [Schuller,1981].



**Figure III-8:**  
Spectre d'absorption du LCR frais dilué à 1/20 dans de l'eau distillée

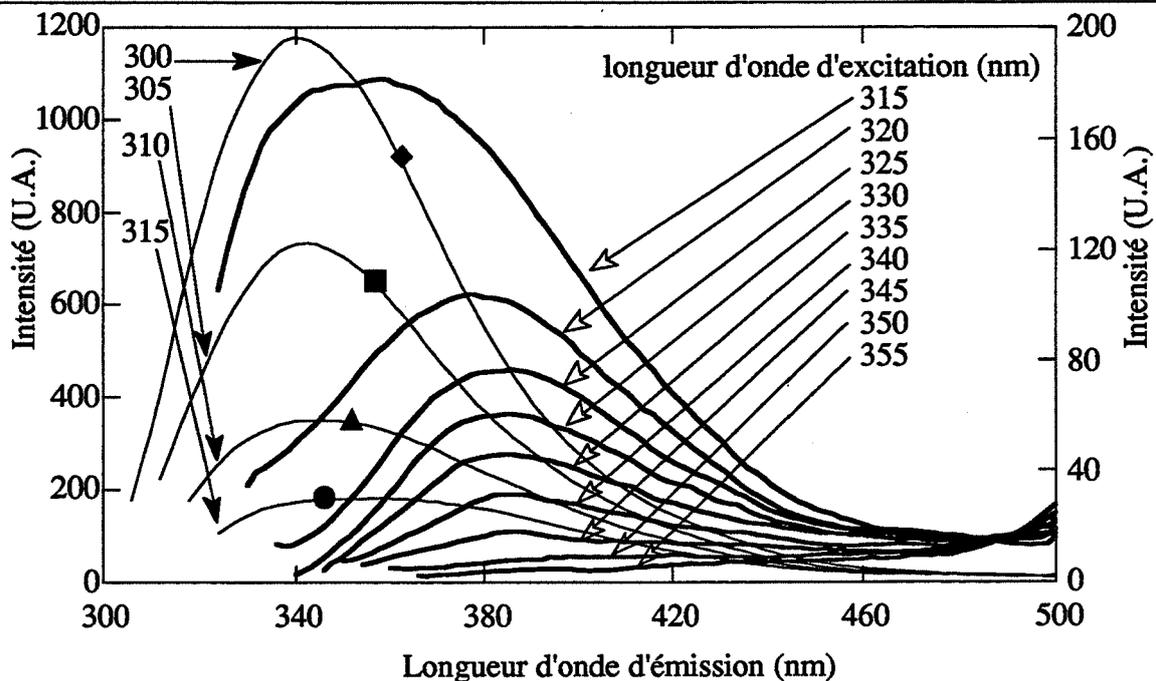


**Figure III-9:**  
Spectres d'absorption du LCR frais sans dilution  
(les deux courbes marquées O et ● correspondent  
à des LCR prélevés sur deux couples de rats différents)

Un des rôles connus de l'albumine, consiste à être une réserve d'acides aminés (1% de tryptophane et 6% de tyrosine [MacLaren,1964]). Sur la Figure III-9 les points importants à souligner sont l'absence de pic visible attribuable au NAD(P)H et la valeur de 0.02 de la DO à 337 nm. Cette faible valeur indique que seul 5% du laser azote est absorbé (ou diffusé) sur un trajet de 200  $\mu\text{m}$ . Le comportement ventriculaire est cependant différent de l'échantillon tissulaire car il est lui-même préservé par une barrière. Les remarques ci-dessus sont uniquement indicatives vis-à-vis des propriétés photophysiques de ce liquide.

### III.C.3.b.ii. Fluorescence statique du LCR

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été balayées respectivement de 200 nm à 500 nm et de 250 nm à 550 nm par pas de 5 nm (Figure III-10, Figure III-11 et Figure III-12). Pour des longueurs d'onde d'excitation inférieure à 315nm, seule l'émission centrée à 340nm a pu être observée avec un maximum d'émission pour des excitations à 230 et 295nm. La même émission est retrouvée dans le sérum humain [Wolfbeis,1985b]. L'émission à 340 nm peut être raisonnablement attribuée au tryptophane bien que celle-ci s'étende un peu plus vers le rouge. En outre certains auteurs ont rapporté que d'autres composés que le tryptophane présentaient des données spectrales assez semblables dans la région 295/405 nm dans le sérum [Swan,1983].



**Figure III-10:**

Spectres d'émission du LCR

soustraites des spectres d'émission du LCR dilué à 1/6 dans de l'eau distillée  
Les courbes marquées par un symbole sont relatives à l'ordonnée de gauche.

Pour des longueurs d'onde d'excitation supérieure à 315nm, deux faibles émissions ont été identifiées: l'une centrée vers 390nm et l'autre vers 530nm. L'attribution moléculaire de l'émission à 390nm n'est pas aisée. Mabuchi et al ont détecté la présence de nombreux composés endogènes fluorescents dans l'ultrafiltrat de sérum humain par HPLC avec une détection à 415 nm sous une excitation à 322 nm [Mabuchi,1983]. Wolfbeis et coll. ont présenté certaines identifications moléculaires concernant les dérivés du tryptophane [Wolfbeis,1985], [Wolfbeis,1985b]: l'indoxyl sulfate (indican) 290/385 nm, l'acide 3-Hydroxyanthranilique 320/415 nm, et les composés de la famille de la vitamine B<sub>6</sub> (pyridoxine) 290-320/390 nm (photolabile). Les pics à 370/530 nm et 450/530nm apparaissent sur les Figure III-11 et Figure III-12. Les bandes Raman de l'eau sont comprises dans la bande d'émission pour des longueurs d'onde d'excitation supérieure à 410 nm. On retrouve ces résultats pour le sérum humain [Wolfbeis,1985b]. Wolfbeis et al attribuent les pics 450/530 nm à la bilirubine liée à l'albumine. Ce composé est photolabile et peut entraîner des modifications sur des niveaux d'intensité mesurés de ces pics en fonction de l'instrumentation mise en œuvre. Les pics vers 370/530 nm sont, eux, partiellement identifiés et proviendraient des flavines (riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) et forme oxydée des flavines) [Wolfbeis,1985b].

Contrairement aux résultats obtenus sur le sérum [Wolfbeis,1985b], aucune émission mesurable n'a été détectée à 460nm, attribuable au NAD(P)H. Cependant comme nous l'avons suggéré précédemment, le LCR des cavités ventriculaires est dans un compartiment différent de celui de l'échantillon tissulaire analysé par la FO. En toute rigueur les données relatives aux mesures réalisées à ce niveau, ne peuvent être étendues à l'ensemble du cerveau.

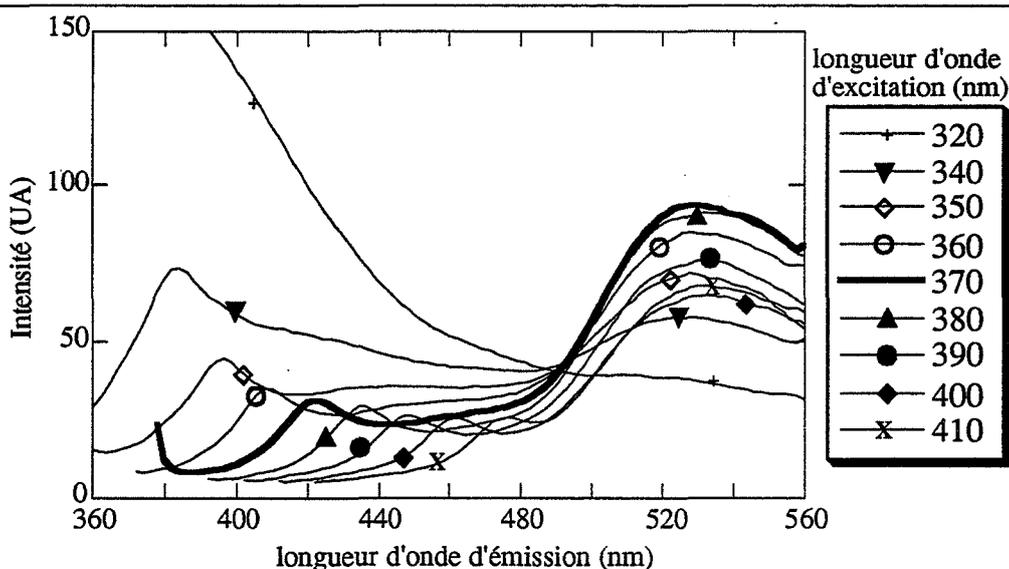


Figure III-11: Spectres d'émission du LCR sous excitation de 320nm à 410nm

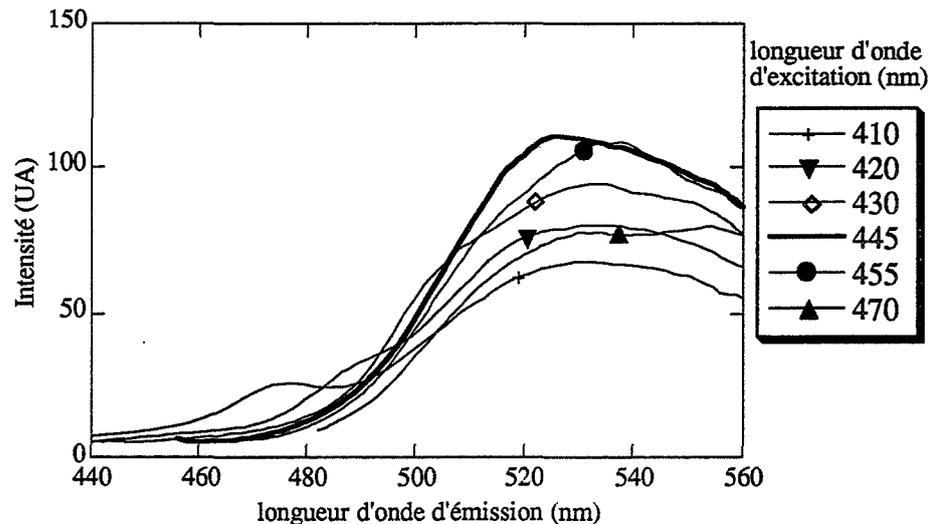


Figure III-12: Spectres d'émission du LCR sous excitation de 410nm à 470nm

### III.C.3.b.iii. Mesure du LCR par le FOCS

Les résultats obtenus apparaissent sur la Figure III-13. Une très faible fluorescence a été mesurée confirmant les résultats obtenus en absorption et en fluorescence statique.

### III.C.3.b.iv. Conclusion sur les mesures du LCR

A la vue de ces résultats, il pourrait être suggéré que les mesures réalisées dans le tissu soient peu affectées par le LCR où elles baignent. Il faut toutefois marquer une réserve car le LCR des cavités et celui tissulaire peuvent être différents. Ce dernier peut refléter des événements locaux variables et toutefois opposés selon la zone cérébrale considérée; le LCR ventriculaire ne reflète que l'intégrale de ces variations spécifiques. Pour prendre en compte ces réserves, nous avons généralement utilisé le terme "endogène" qui englobe les compartiments intracellulaire et extracellulaire.

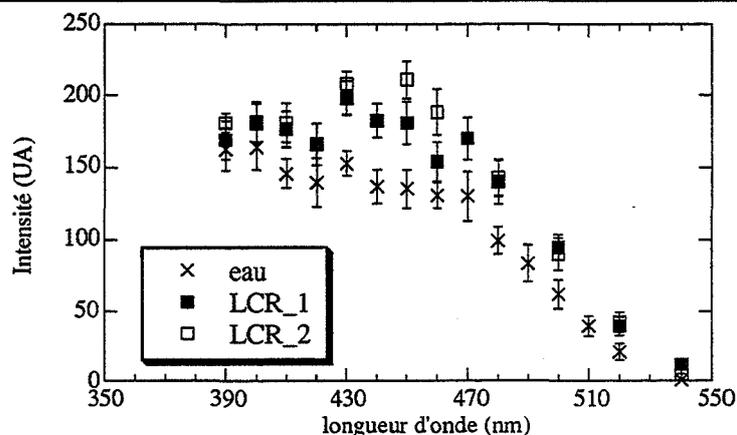


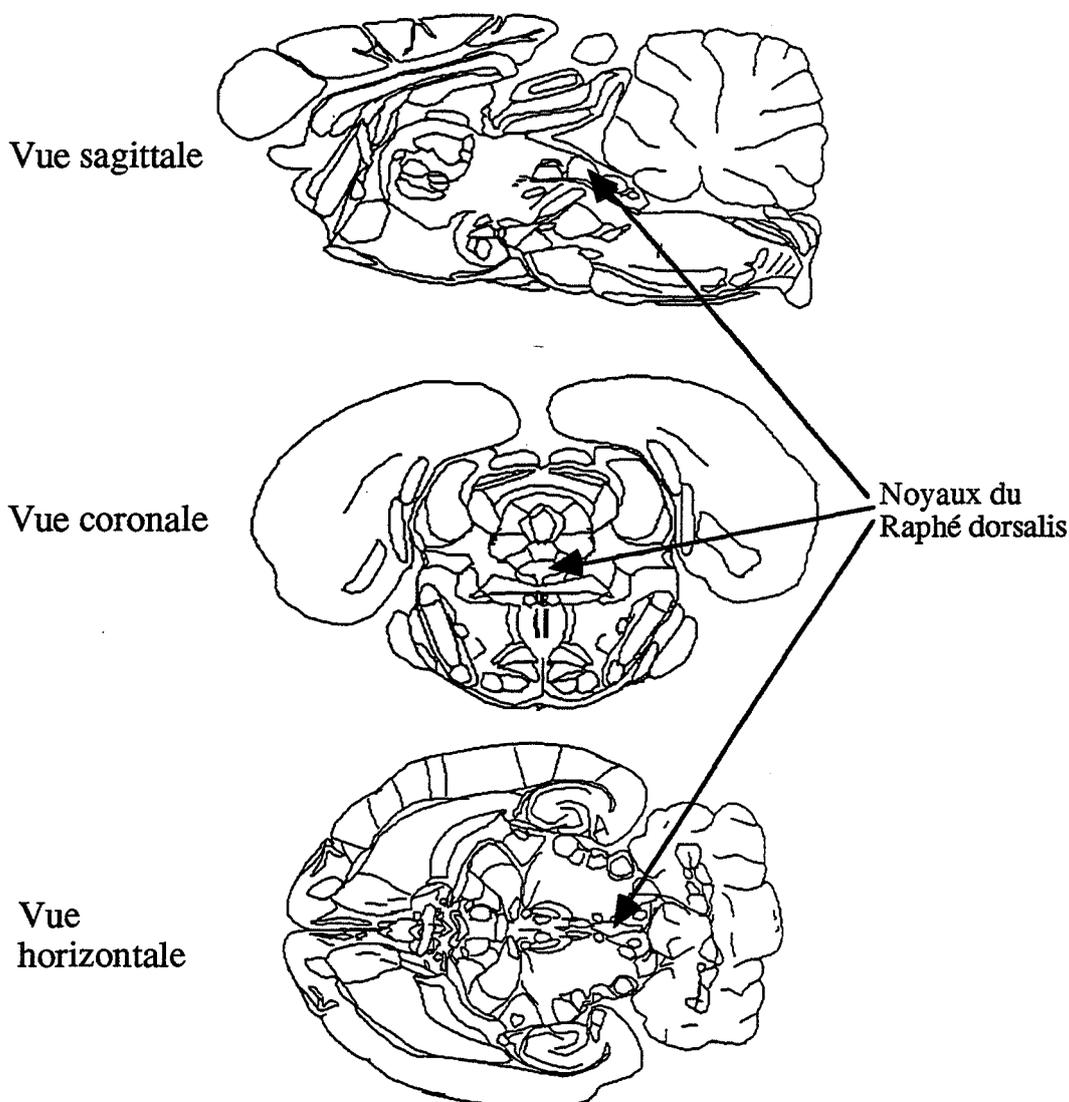
Figure III-13: Spectres d'émission du LCR frais sous excitation à 337nm mesurés par le FOCS (Chaque solution de LCR est issue d'un couple de rat; l'eau utilisée est de l'eau milliQ; les barres d'erreurs représentent la déviation standard (n>10) ).

### III.C.3.c. Spectroscopie UV-Vis de l'autofluorescence dans deux structures cérébrales

#### III.C.3.c.i. Présentation des deux zones cérébrales cibles

La Figure III-14 montre sur les trois plans que le nRD est en position très centrale. La première description de neurones contenant de la 5-HT a été réalisée grâce à des techniques d'histofluorescence [Houdouin,1991]. Les corps cellulaires de ces neurones sont essentiellement situés dans les noyaux du raphé du tronc cérébral.

Les projections sérotoninergiques issues des noyaux du raphé sont très largement distribuées dans tout le SNC. Les projections de cet ensemble cellulaire couvrent l'ensemble du cerveau ce qui est assez exceptionnel.

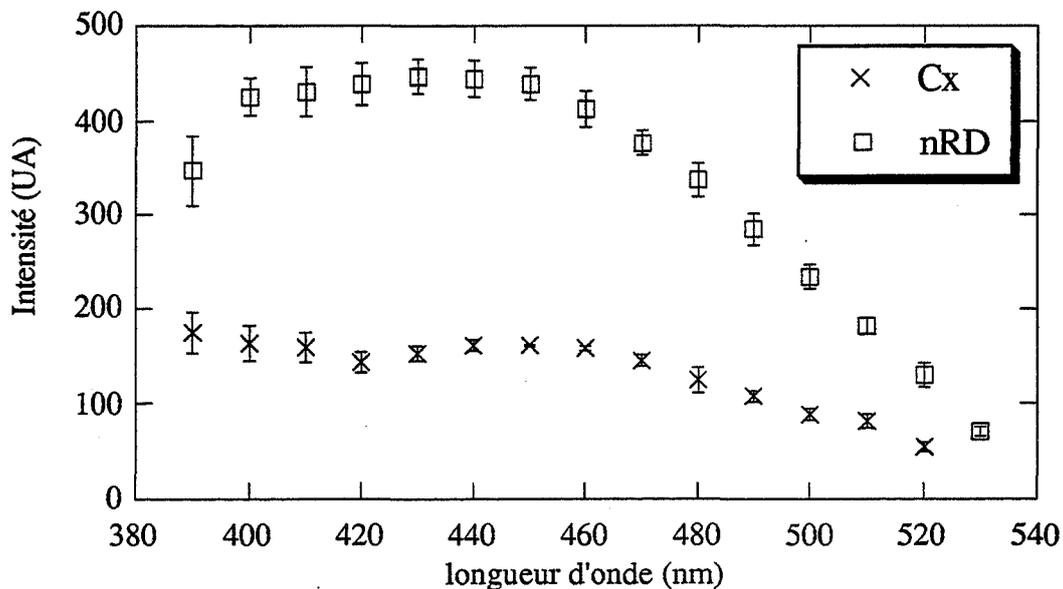


**Figure III-14:**  
Position du nRD chez le rat dans les trois plans [Paxinos,1983]

Pour notre approche, nous avons choisi une projection importante et facile d'accès: le cortex (Bregma=-0.26, Latéral=2, Vertical=0.5, [Paxinos,1983]). Cette projection provient du nRD, noyau bien connu pour son implication dans la régulation des états de vigilance. Chez le rat ce noyau se présente sous une forme oblongue de 1 mm de long et 500  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il est situé juste en dessous du troisième ventricule: sa taille submillimétrique a donc nécessité la réalisation d'un capteur de diamètre inférieur à 500  $\mu\text{m}$ .

### III.C.3.c.ii. Données spectrales expérimentales

La Figure III-15 montre les différences de niveau de fluorescence entre les deux zones étudiées sur un seul animal ainsi que leur spectroscopie sur un domaine d'émission s'étendant de 390 à 530nm. Sur tous les animaux étudiés la fluorescence du nRD est supérieure ou égale à celle mesurée au niveau du Cx.



**Figure III-15:**  
Spectres du nRD et du Cx obtenus chez le même animal sur une journée  
(n=5; les barres d'erreur représentent les erreurs standards)

Nous nous sommes aperçus que la fluorescence sur la zone 380-440nm fluctuait plus que celle de l'autre versant et que cette variation est dépendante du temps qui s'est écoulé entre l'insertion dans la canule et la mesure. Sur la Figure III-16, les spectres normalisés à 1 pour la longueur d'onde 460nm ont été reportés en fonction du temps zéro d'insertion dans la canule pour deux animaux. Plus ce temps augmente plus le premier pic apparent (sur 390nm) s'estompe. De plus il faut souligner que le versant du deuxième pic s'étalant de 460 à 530nm reste assez constant.

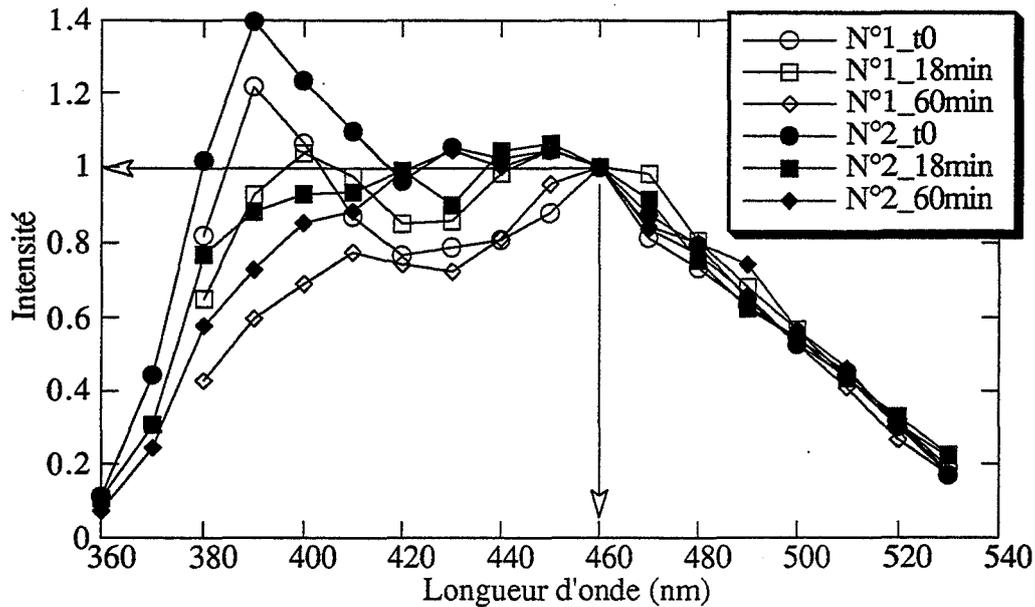


Figure III-16:

Spectres consécutifs (N°1 et N°2) normalisés d'émission du nRD  
 (Le temps  $t=0$  est le moment d'insertion de la FO dans la canule;  
 les temps indiqués correspondent au temps du premier point  
 (380nm ou 360nm) du spectre)

Les spectres d'émission de solutions de NADH (tampon pH7) à diverses concentrations réalisées après les mesures *in vivo* indiquent que les concentrations de NADH donnant des intensités comparables à celle obtenus dans le nRD sont de l'ordre de 15  $\mu\text{M}$  (Figure III-17). Les comparaisons des spectres de fluorescence du nRD et du Cx avec ceux du NADH *in vitro* présentent une bonne corrélation sur le domaine 460-530 nm. Ce point apporte un élément supplémentaire pour l'identification moléculaire de l'émission mesurée *in vivo* au niveau du nRD.

Cependant la spectroscopie des résultats *in vitro* seule n'autorise pas à des conclusions absolument garanties vis-à-vis de la nature moléculaire des émissions mesurées *in vivo*. Il serait indispensable de compléter l'identification spectroscopique par une signature d'ordre pharmacologique. Or il n'existe pas de substances propres comme les IMAO pour la 5-HT, permettant un blocage transitoire et spécifique du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  sauf certains poisons type cyanure. Donc une telle identification pharmacologique est impossible. Cependant dans la partie bibliographique précédente "Rappels sur la fluorimétrie cérébrale *in vivo*", nous avons vu que les variations relatives de fluorescence sont en corrélation avec la composition en dinucléotide obtenu par analyse biochimique *post-mortem* [Chance,1962].

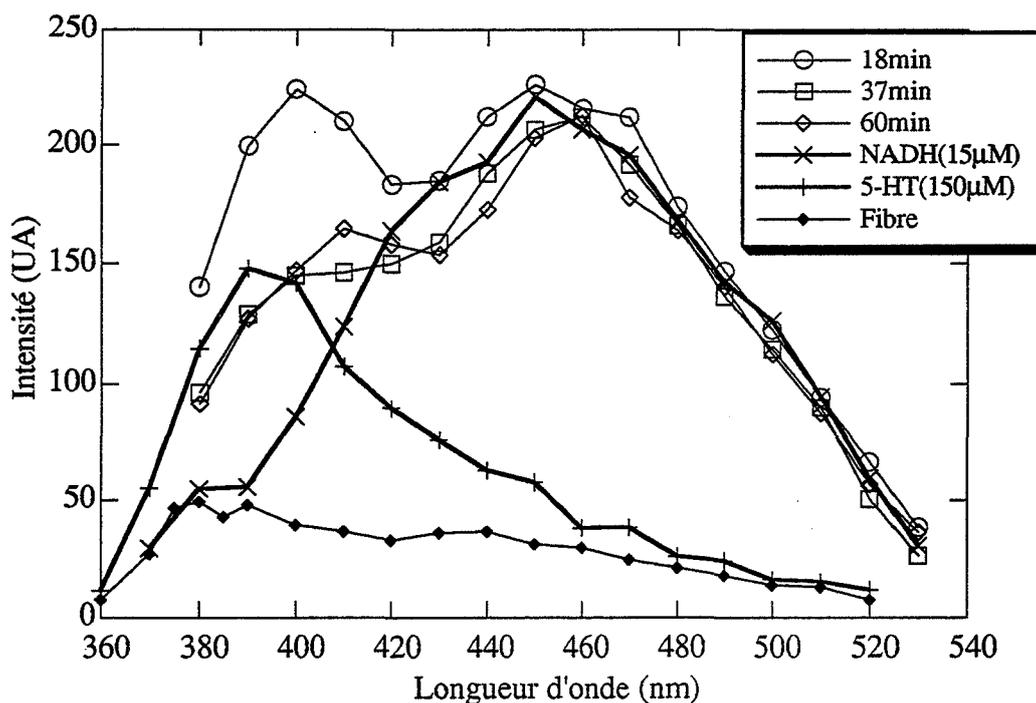


Figure III-17:

Spectres, non corrigés consécutifs, d'émission:

- du nRD *in vivo* (Le temps  $t$  égal zéro est le moment d'insertion de la FO dans la canule. Les temps indiqués correspondent au temps du premier point (380nm) du spectre).
- du NADH (15  $\mu$ M à pH7) *in vitro*,
- de la 5-HT (150  $\mu$ M à pH7) *in vitro*,
- et du tampon (FOCS dans le tampon seul).

### III.C.3.c.iii. Discussion sur la mesure de la 5-HT *in vivo*

En outre nous avons reporté sur la Figure III-17, un spectre d'émission de la 5-HT (tampon pH 7). Celui-ci a été mesuré juste avant la mesure *in vivo*. L'émission de la 5-HT *in vitro* à une concentration de 150  $\mu$ M donne un niveau d'intensité collectée comparable de celui mesuré *in vivo* du nRD. A cause de la différence entre les deux milieux *in vivo* (très diffusants et possédant une réflectance non négligeable) et *in vitro* (peu diffusants), il est périlleux de comparer des niveaux de concentration sans réserve. Seulement quelques remarques sur les niveaux de fluorescence seront explicitées.

Nous avons vu que l'émission du LCR est négligeable et, au chapitre précédent, que les niveaux de 5-HT extracellulaire et tissulaire de 5-HT pour le nRD sont respectivement de l'ordre du nanomolaire et de  $3.9 \pm 0.9$  nmole/g, soit de 4  $\mu$ M pour une densité de un [Adell,1991]. Ainsi si la fluorescence mesurée à 400 nm n'est issue que de la 5-HT, le FOCS donnerait un signal équivalent à

- 150 $\mu$ M de 5-HT en solution
- et de 4 $\mu$ M de 5-HT dans le tissu cérébral du nRD.

Si on exclue, par hypothèse, une augmentation du rendement quantique ou toute autre modification des propriétés de la 5-HT *in vivo*, ce rapport s'élève à 37.

Finalement il apparaît à ce niveau que c'est essentiellement le compartiment intracellulaire qui serait mesuré pour la 5-HT. Alors qu'avec la voltamétrie, la mesure est réalisée uniquement dans le compartiment extracellulaire. Ce point est assez défavorable pour la technique du capteur extrinsèque développé *in vivo*. La réalisation d'un capteur mesurant la 5-HT dans le seul compartiment extracellulaire est néanmoins possible. Il nécessite une membrane opaque perméable à la 5-HT disposée en bout de FO. En tenant compte des données photophysiques de la 5-HT, un laser accordable de 280-325nm est nécessaire. Nous étudierons ces perspectives au chapitre "Conclusion et perspectives".

#### III.C.3.c.iv. Effet tissulaire

Nous avons vu à la fin du chapitre "Matériel et méthode" le calcul de l'efficacité de collection de la fluorescence obtenue par les FOCS. Mais ce calcul est limité aux solutions et ne prend pas en compte la turbidité, la réflectance et les diffusions lumineuses du tissu. Dans cette partie nous avons souligné le fait que, dans le cas de solution peu absorbante et pour les FO utilisées, la longueur de 2 mm définit le volume d'où 90% du signal de fluorescence est issu. Par contre *in vivo* le signal ne proviendrait que d'un volume d'une épaisseur inférieure à 500 $\mu$ m [Chance,1962].

La propagation et les interactions de la lumière dans les tissus *in vivo* sont des domaines de recherche qui connaissent un renouveau en particulier en liaison avec les thérapies photodynamiques mises en œuvre en cancérologie (ablation de tumeur et aide au diagnostic en temps réel et *in situ*) [Miro,1985], [Preuss,1989], [Yarborough,1992].

Les premiers travaux sur les interactions de la lumière avec les tissus *in vivo* ont porté sur l'absorption, la réflectance de la peau humaine [Everett,1966]. Récemment la résolution temporelle subnanoseconde de la lumière transmise et réfléchi par le tissu a été abordée de manière non invasive [Patterson,1989], [Jacques,1989].

Les propriétés optiques du tissu peuvent être décrites par:

- $\mu_a$  coefficient d'absorption en  $\text{cm}^{-1}$ ,
- $\mu_s$  coefficient de diffusion en  $\text{cm}^{-1}$ ,
- et  $g$  l'anisotropie égale au  $\cos \theta$  (où  $\theta$  est l'angle de déflexion pour un seul événement de diffusion).

L'absorption totale est notée  $\mu_t$ :  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ .

Les propriétés d'absorption et de réflexion du tissu du foie entre 350 et 2200 nm ont été mesurées afin de déterminer un modèle plus exact de la propagation de la lumière dans les tissus (équation du transport radiatif) mais les erreurs restent importantes [Parsa,1989]. Pour 350 nm ces auteurs donnent un  $\mu_a$  de  $70 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ , un  $\mu_s$  de  $230 \pm 20$

$\text{cm}^{-1}$  et  $g$  égal à 0.9. De plus les pics d'absorption mais aussi de diffusion à 420 nm ont été mesurés respectivement à  $80 \pm 10 \text{cm}^{-1}$  et  $250 \pm 20 \text{cm}^{-1}$ . Ceux-ci sont attribués à la déoxyhémoglobine. Avec le modèle qu'il présente

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a (\mu_a + \mu_s (1-g))}, \text{ avec les valeurs expérimentales de } \mu_a, \mu_s \text{ et } g,$$

$$\mu_{\text{eff}} = 121 \text{cm}^{-1}, \text{ la diminution de la lumière est exponentielle } \frac{I(z)}{I_0} = k e^{(-\mu z)}, k \text{ étant}$$

un facteur allant de 1 à 5 et représentant les effets des conditions limites du conducteur lumineux (FO ou air) / tissu (effet de réflectance spéculaire). Avec ce modèle et  $k$  égal à 1, il ne reste que 55% de lumière au bout de  $50 \mu\text{m}$ , 30% après  $100 \mu\text{m}$  et 9% à  $200 \mu\text{m}$ . Ce modèle montre que pour ces longueurs d'onde le tissu est beaucoup plus diffusant qu'absorbant, interdisant l'utilisation de la loi de Beer Lambert, valable *in vitro* pour les solutions que nous avons utilisées. Par comparaison, la solution de  $15 \mu\text{M}$  de NADH présentait une absorption de  $0.084 \text{cm}^{-1}$ .

En raison de l'effet tissulaire, il est donc difficile de savoir si le signal mesuré *in vivo* à 400nm est dû aux  $4 \mu\text{M}$  de 5-HT du compartiment intracellulaire. Dans ce sens la recherche de composés endogènes susceptibles de donner une fluorescence sous excitation à 337nm s'avère aussi importante.

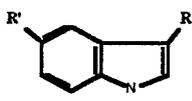
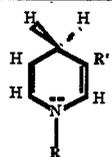
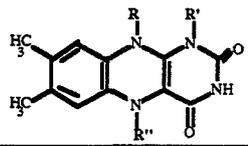
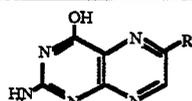
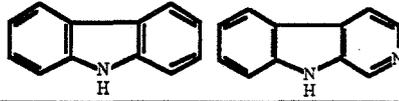
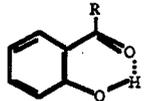
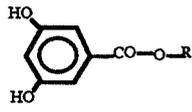
### III.C.3.c.v. Composés endogènes fluorescents sous excitation à 337nm

Le travail le plus récent de compilation générale des composés naturels fluorescents est celui de Wolfbeis, O.S. [Wolfbeis, 1985]. Cependant cet auteur s'est limité aux composés dont la structure moléculaire est bien établie. De plus il n'a pas abordé la fluorescence de "systèmes organisés" comme les cellules ou les membranes.

Concernant la fluorescence de systèmes organisés, le tableau ci-dessous indique sur une base bibliographie récente les tentatives d'identification moléculaire de différents matériaux biologiques:

liquides biologiques/ tissus	Référence
le sérum	[Wolfbeis, 1985b]
tissu du sein normal et cancéreux	[Alfano, 1989]
agro-alimentaire (céréales, poisson, viande)	[Gallant, 1991]
culture de micro-organismes	[Li, 1991]
culture cellulaire	[Schneckenburger, 1992]
tissus végétaux	[Stober, 1992], [Cerovic, 1993]

En fait il n'existe que quelques familles de composés qui présentent une fluorescence native sous excitation au dessus de 260nm. L'absence de fluorescence est souvent due à l'absence de système d'électrons  $\pi$ . L'ensemble des fluorophores des corps biologiques fluorescents sous excitation à 337nm et émettant dans le domaine 360-460 nm reste néanmoins assez vaste (Tableau III-3) :

noyau fluorophore	formule chimique	substances
indol; 5-hydroxindol		tryptophane; sérotonine; alcaloïdes indoliques (LSD, ergoline); <i>métabolites (ouverture du cycle): acides kynurenine et anthranilique</i>
pyridine; 3-hydroxypyridine		NAD(P)H, acide nicotinique (vitamine PP); pyridoxamine, phosphate de pyridoxal
isoalloxazine		FAD, FMN, riboflavine (vitamine B <sub>2</sub> )
p-aminobenzamide		acide folique (contient les deux fluorophores);
ptérine; 2-amino 4-hydroxy-ptéridine		dihydrofolate; tetrahydrofolate; lumazine (2,4dihydroxyptéridine) des bactéries luminescentes;
quinoline; isoquinoline		quinine; alcaloïdes; papaverine; berbérine
carbazole; carboline		ellipticine; harman
salicylique		métabolites de l'aspirine
acides m, p, di-, tri- benzoïque; ester et amino-benzoïque		acide férulique(; acide anthranilique (2-aminobenzoïque); acide gentisique (2,5-dihydroxybenzoïque); acide gallique; acides hydroxycinnamique; acide sinapique
des cycles avec un Oxygène: chromone; flavone, coumarine		essentiellement au niveau des plantes

**Tableau III-3:**  
liste nonexhaustive des fluorophores biologiques qui fluorescent  
vers 370-470nm sous excitation à 337nm

### III.C.3.c.vi. Données temporelles

La Figure III-18 présente une comparaison entre les formes temporelles du signal de fluorescence au niveau des deux zones cérébrales étudiées et du signal obtenu avec du NADH libre *in vitro* (amplitude comparable et loin de la saturation du détecteur). Les

TRF des deux zones cérébrales sont des moyennes sur 2560 coups laser. Les comparaisons entre trois animaux ont donné des formes temporelles semblables. Il faut souligner les faibles variations de la forme temporelle de la fluorescence des deux zones cérébrales suivant la longueur d'onde d'émission. Cette similitude est inattendue car on aurait pu penser que les deux pics (centrés vers 390 et 460 nm) apporteraient des temps de fluorescence différents. Les temps de fluorescence du nRD et du Cx *in vivo* sont de l'ordre de 2ns (Figure III-19). Nous avons indiqués dans la partie consacrée aux propriétés photophysiques du NAD(P)H que sa forme libre présente 2 temps de déclin subnanosecondes (0.25 et 0.69ns), alors que lié à une enzyme ces temps sont de l'ordre de la nanoseconde (1.5 à 4 ns). Cependant avec l'IRF obtenue avec notre appareil, nous ne pouvons pas prétendre résoudre des temps de déclin inférieurs à 0.9ns, de ce fait la détermination des temps de fluorescence du NAD(P)H libre *in vitro* n'ont pas pu être réalisés.

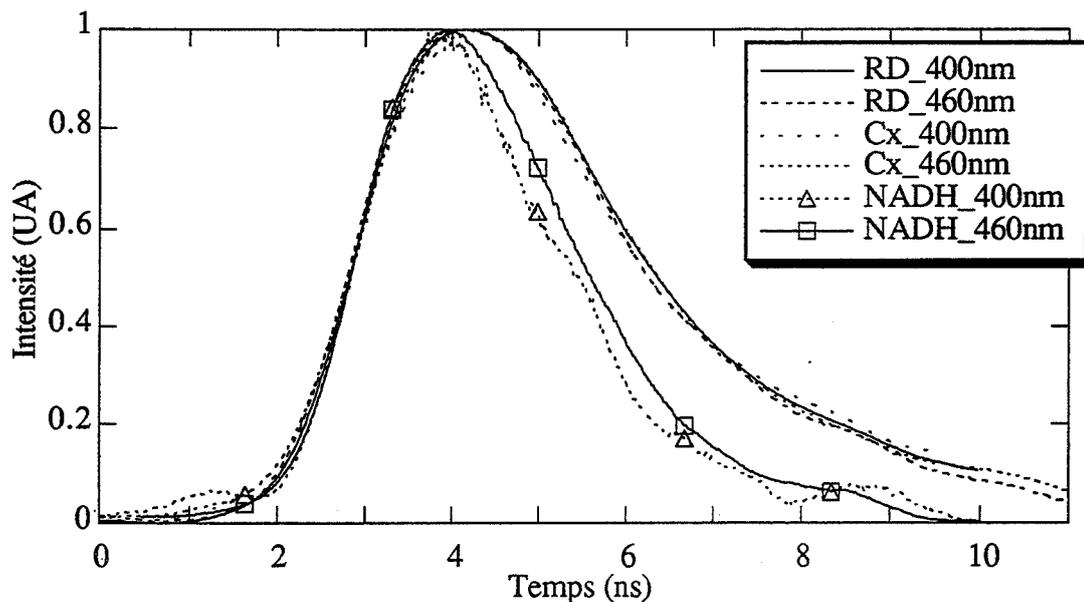
**La mesure *in vivo* et à 460nm des temps de déclin de 2ns oriente plutôt vers l'attribution de la fluorescence observée au NAD(P)H sous la forme liée.**

#### III.C.3.c.vii. Effets liés à l'insertion de la FO , ligne de base

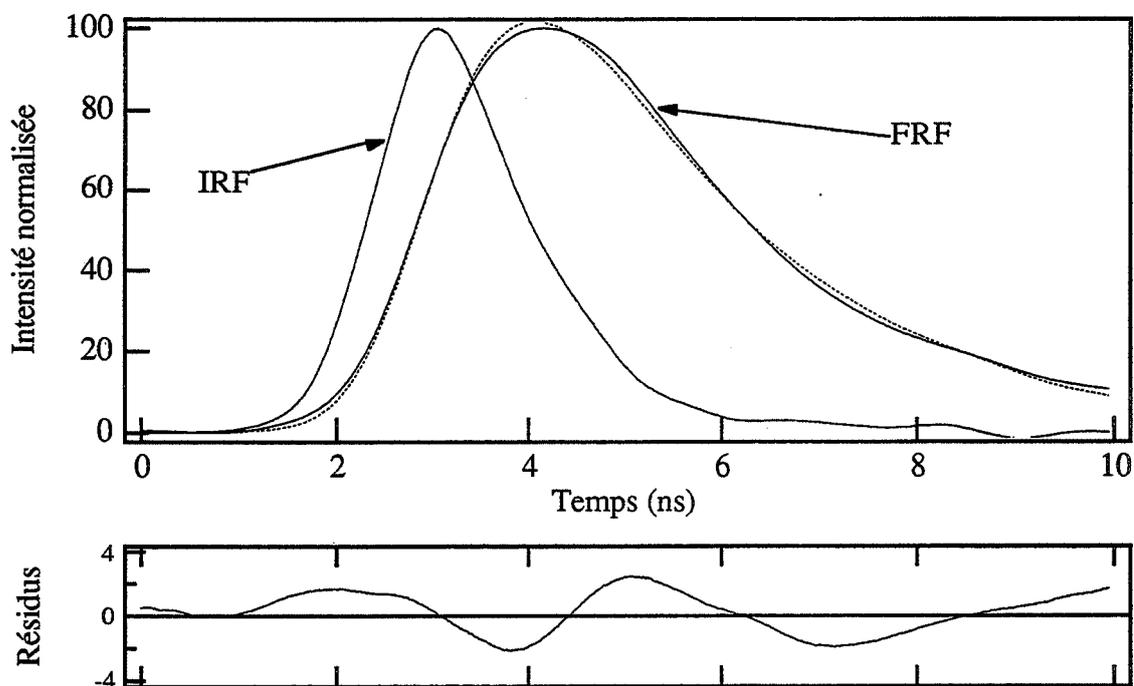
Un point important est l'effet lié à l'insertion de la FO dans la canule ainsi que les premiers effets exercés par l'excitation du laser sur le tissu. Pour tous les animaux testés et pour les deux zones cérébrales visées, une variation importante du signal a été observée. Modélisée par une exponentielle décroissante, cette cinétique présente des temps de 10 à 30 minutes (Figure III-20). Un niveau de base stable est atteint après une période allant de 30 à 90 minutes. Lorsque la zone cérébrale a été plusieurs fois l'objet de mesure, cet effet disparaît. L'amplitude de cet effet semble aussi en partie dépendante de la façon de mettre la FO (brutale, progressive...).

Pour objectiver cet aspect, nous avons sélectionné l'intensité à 9ns chez un animal (Figure III-21); une diminution significative et de même forme que l'intensité globale apparaît à 400nm, par contre, à 460nm une légère augmentation non significative du temps de déclin de fluorescence est mesurée.

Les effets mécaniques liés à la mise en place de la FO (lyse de quelques cellules) sont sans doute responsables de cet effet. Une question reste posée: dans quel compartiment est le NADH responsable de cette augmentation?



**Figure III-18:**  
TRF du nRD et du Cx *in vivo* et du NADH ( $15\mu\text{M}$ , pH7) *in vitro*  
à deux longueurs d'onde d'émission (400 et 460nm)



**Figure III-19:**  
Comparaison de la FRF obtenue *in vivo* et  
de la convolution IRF-{monoexponentielle de 2ns} (en pointillée)

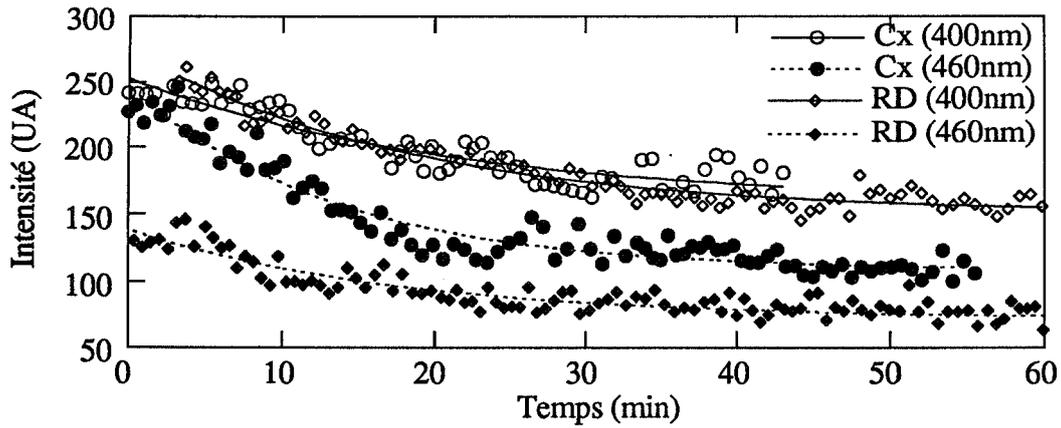


Figure III-20:

Décroissance de la fluorescence mesurée *in vivo* au niveau du nRD et du Cx à deux longueurs d'onde d'émission (400 et 460nm) lors de la première insertion de la FO.

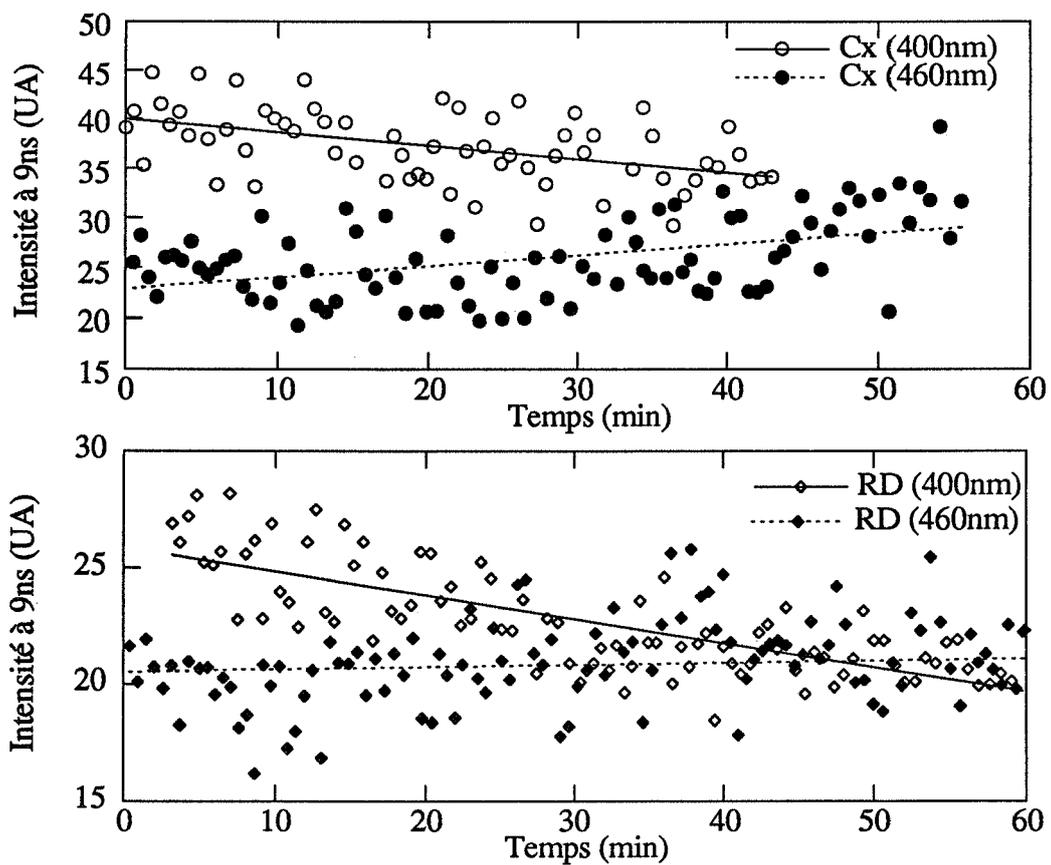


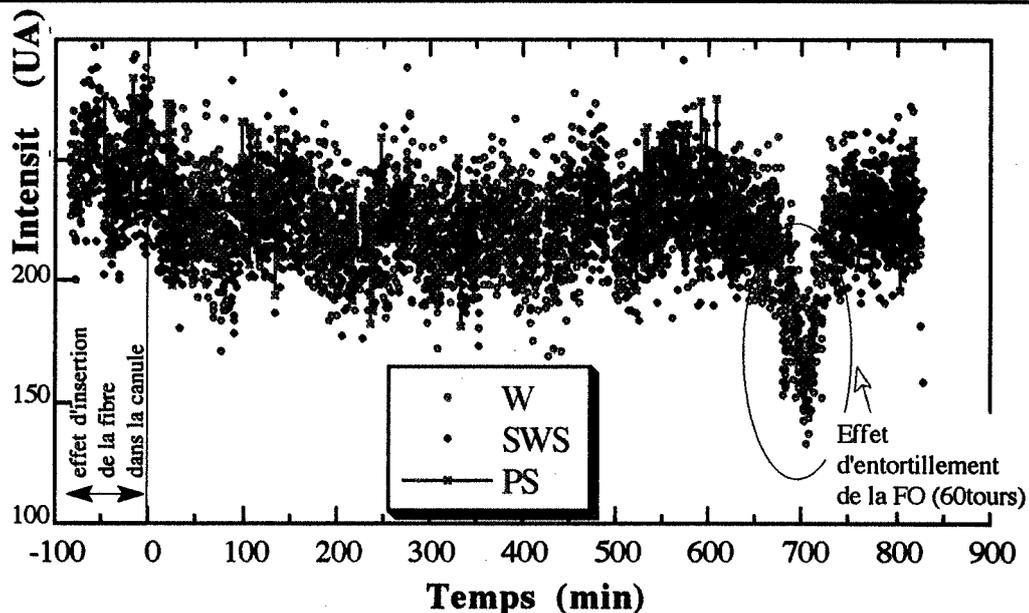
Figure III-21:

Variations de l'intensité de la fluorescence (à 9ns) dérivée du nRD et du Cx à deux longueurs d'onde d'émission (400 et 460nm) lors de la première insertion de la FO.

### III.D. Applications du FOCS implanté

#### III.D.1. Etude de la variation du niveau du NADH en fonction des états de vigilance

Le FOCS utilisé pour cette étude permet de mesurer l'autofluorescence des tissus cérébraux profonds sur des périodes pouvant couvrir un cycle nyctéméral. Sur la Figure III-22 sont représentées sur une période de 15h, les variations physiologiques de la fluorescence du signal à 460nm au niveau du nRD. La corrélation de chaque point de mesure avec l'état de vigilance correspondant (analysé avec l'EEG) y est reportée.



**Figure III-22:**  
Variations de l'intensité de fluorescence mesurée à 460nm au niveau du nRD  
(chaque point représente une mesure sur 10s)

#### III.D.1.a. Résultats expérimentaux

Sur les Figures III-24 et III-23 les moyennes du signal mesuré à 460nm sont exprimées en % par rapport à l'éveil (fixé à 100%) et établies à partir de sessions expérimentales de différentes durées, le nombre de points de mesure pour chaque phase est indiqué. La significativité des résultats est déterminée par le test de Student unilatéral. Les niveaux de significativité (hypothèse  $H_0$ : moyenne égale entre deux classes) sont représentés par une étoile pour  $p < 5\%$ , deux étoiles pour  $p < 1\%$  et trois étoiles pour  $p < 0.1\%$ . Pour ces études statistiques nous n'avons pas pris en compte les points obtenus lors de l'insertion de la FO (1<sup>ère</sup> heure) ni les zones d'enregistrement où la fibre présentait un entortillement dépassant 20 tours.

En général, les variations mesurées sont assez faibles, les valeurs moyennes par classe d'état de vigilance demeurent dans une gamme de 4 à 11% (déviations standards). Cependant le nombre important de point de mesure (de 300 à 4000) permet d'atteindre des niveaux de significativité. Bien que les sessions expérimentales aient été réalisées en début d'après-midi (maximum de phase de SWS et de PS) le nombre de points obtenus dans la classe PS est resté faible. Il est probable que l'arrivée de l'animal dans un autre environnement particulièrement sonore (bruit du laser...) n'ait pas permis un sommeil normal. En effet les phases de PS sont assez courtes (20s) et souvent entrecoupées de micro éveils.

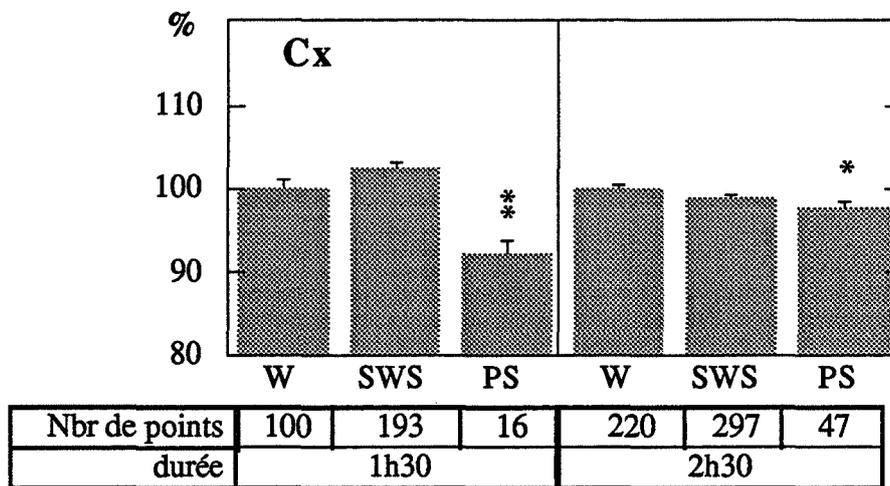


Figure III-23:

Fluctuations du signal mesuré à 460nm au cours du cycle veille-sommeil au niveau du Cx (moyennes du signal exprimées en % par rapport à l'éveil (100%) sur une session; résultats sur deux animaux (2cycles et 3 cycles, alternance consécutive de W, SWS et PS et chaque point représente 10s de mesure; les barres d'erreur représentent l'erreur standard )

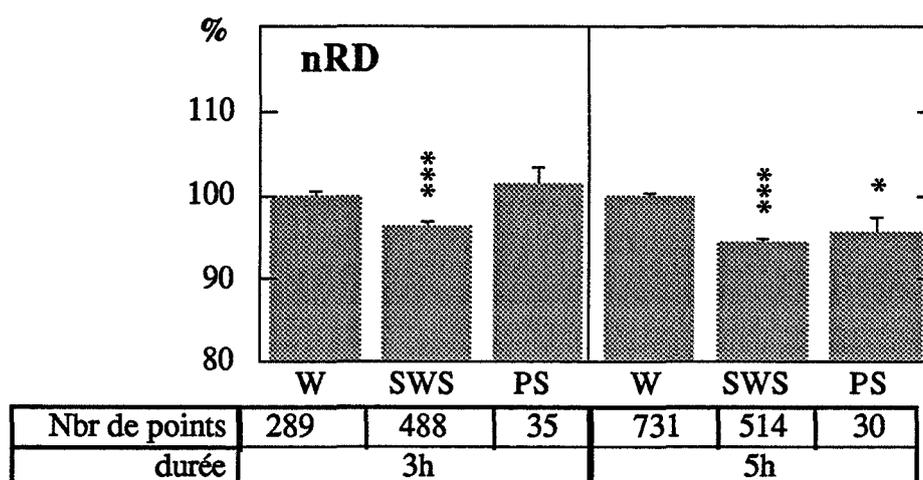


Figure III-24:

Fluctuations du signal mesuré à 460nm au cours du cycle veille-sommeil au niveau du nRD (moyennes du signal exprimées en % par rapport à l'éveil (100%) établies sur deux sessions pour deux animaux (sur deux fois 3 cycles)).

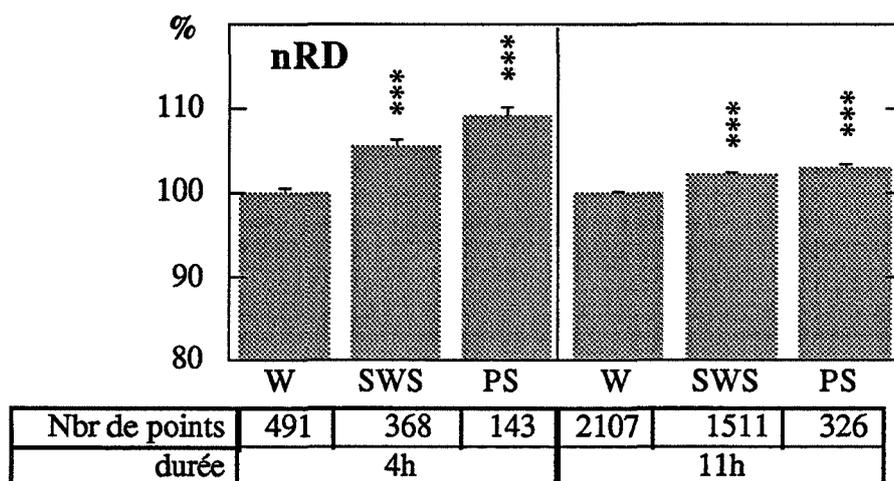


Figure III-25:

Fluctuations du signal mesuré à 460nm au cours du cycle veille-sommeil au niveau du nRD (moyennes du signal exprimées en % par rapport à l'éveil (100%) établies sur deux sessions pour deux animaux (sur 3 et 6 cycles); chaque point représente 10s de mesure; les barres d'erreur représentent l'erreur standard)

### III.D.1.b. Discussion

Malgré de nombreuses questions sur la nature oxydative du métabolisme mis en jeu pendant le PS, aucune donnée sur les variations du NADH cérébral survenant au cours du cycle veille-sommeil, n'ont été répertoriées dans la littérature. Le NADH, n'est pas un neurotransmetteur ni un métabolite de neurotransmetteur comme les composés accessibles par la voltamétrie. Du fait de son implication dans diverses réactions biochimiques, les variations spontanées du NADH mesurées sont très faibles. A ces faibles variations vient

se rajouter la difficulté d'enregistrer un état SWS ou PS constant sur plusieurs minutes. En outre des différences sur le sens des variations ont été enregistrées suivant les animaux (Figure III-24 et Figure III-25). Ces différences pourraient provenir des lieux de mesure comme cela a été reporté pour la voltamétrie. Au niveau du nRD, les variations spontanées de la hauteur du signal de voltamétrie des 5-OH dépendent du lieu de mesure [Houdouin,1991]:

- partie antérieure et ventrale du nRD, augmentation pendant le SWS et le PS;
- zone antérieure et dorsale, augmentation seulement pendant le PS.

Avec le FOCS, l'augmentation pendant le SWS et le PS a été effectivement obtenu pour 2 animaux pour la partie antérieure et ventrale du nRD.

De même que pour le capteur voltamétrique, si le FOCS est situé à la limite (en particulier contre le troisième ventricule) ou à l'extérieur du nRD, des variations différentes ont été enregistrées pendant un même état de vigilance.

La comparaison statistique entre les deux groupes W et PS indique des variations positives pour le nRD et négatives pour le Cx.

**Finallement au niveau de la partie antérieure et ventrale du nRD, une augmentation de la fluorescence (460 nm) a été observée lors du sommeil à ondes lentes (SWS) et du sommeil paradoxal (PS). Au niveau du Cx une phénoménologie inverse semble exister.**

Les résultats fournis par cette nouvelle technique sont à situer dans le cadre général des connaissances sur le fonctionnement des neurones du nRD pendant le cycle veille-sommeil.

#### III.D.1.b.i. Rappels des connaissances sur le fonctionnement des neurones du nRD pendant le cycle veille-sommeil

Les neurones du nRD spécialement les neurones sérotoninergiques qui y sont largement présents, sont électriquement actifs pendant l'éveil et libèrent simultanément de la 5-HT par leurs terminaisons axonales en particulier au niveau du cortex. Chez le chat 77.5% des neurones sérotoninergiques (sur un total de 60300 neurones pour le système cérébral en entier) sont localisés au niveau des noyaux du raphé dont 40.3% pour le nRD [Wiklund,1981]. Des chiffres comparables ont été mesurés pour la souris: 67% des neurones sérotoninergiques sont situés au niveau des noyaux du raphé (sur un total de 26000) dont 35.5% pour le nRD [Takeushi,1988]. Les noyaux du raphé innervent pratiquement l'ensemble du système nerveux (Figure III-26) [Steinbush,1982].

Les neurones sérotoninergiques deviennent progressivement inactifs pendant le sommeil lent pour devenir complètement silencieux pendant le sommeil paradoxal ; à travers ces deux stades de vigilance, la libération axonale de 5-HT est aussi diminuée [Cespuglio,1983]. L'activité électrique unitaire des neurones sérotoninergiques et la



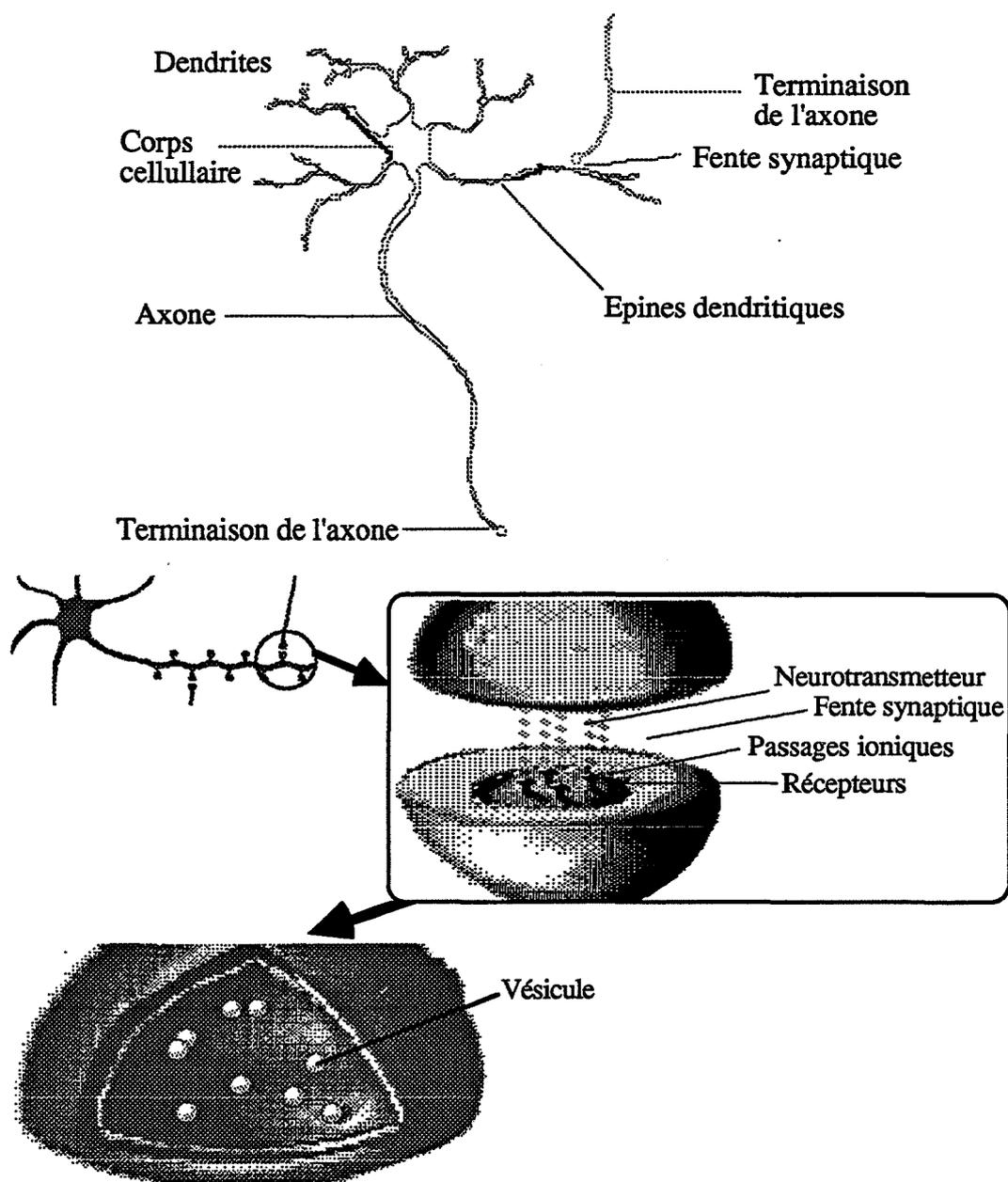


Figure III-27: Schéma d'un neurone

A ces deux modalités de libération, axonale et dendritique, diachronique et synchronique du sommeil, correspondent en plus des rôles fonctionnels différents. La libération axonale est déjà connue pour être impliquée dans de nombreuses fonctions autres que celles du sommeil (régulation de la prise alimentaire, de l'activité sexuelle, de la douleur, de la température...). La libération dendritique intervient sur les fonctions veille-sommeil en étant en partie responsable de l'inhibition de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques qui accompagne toujours le sommeil.

Au niveau du Cx, le signal voltamétrique (corrélé avec le niveau de 5-HT) diminue pendant le SWS et chute encore pendant le PS. Alors que pour le nRD, ce signal passe de 100% à l'éveil à 120% pendant le SWS et 163% pendant le PS [Cespuglio,1992].

Au niveau du nRD, d'autres mécanismes appelés non sérotoninergiques, inhibiteurs des neurones du nRD lors du sommeil, ont été démontrés; en effet chez les chats prétraités par la PCPA (inhibiteur enzymatique de la synthèse de la 5-HT, voir au début du chapitre précédent la partie métabolisme de la 5-HT), des refroidissements localisés du nRD induisent toujours le sommeil paradoxal [Cespuglio,1979]. Le refroidissement du nRD "reproduit" les effets de la libération dendritique de la 5-HT sans la libération de celle-ci inhibée par la PCPA. La nature de ces mécanismes non sérotoninergiques restent encore non identifiée.

Compte tenu de ces données expérimentales de la littérature, il apparaît que la libération dendritique de 5-HT et l'intervention d'autres mécanismes non sérotoninergiques au niveau du nRD pourraient jouer un rôle important pour le déclenchement et le maintien du sommeil.

Pendant le PS, des oscillations d'amplitude importante de la demande en O<sub>2</sub> ont été mesurées dans diverses parties cérébrales [GarciaAustt,1968], [Velluti,1985], [Velluti,1988]. En outre une augmentation du CBF pendant le PS est démontrée [Siesjö,1978]. En tenant compte en plus du tracé EEG du PS, l'ensemble des résultats collectés suggèrent une augmentation du métabolisme pendant cet état.

De plus l'inactivation des neurones du nRD observé pendant le PS qui résulte probablement de l'activation simultanée des dendrites, pose de nombreuses interrogations sur la situation énergétique du cerveau en tant qu'entité homogène.

#### III.D.1.b.ii. Conclusion

**Il faut souligner la corrélation inattendue mise en évidence entre les évolutions spontanées du sommeil au niveau du nRD et du Cx et:**

- le signal voltamétrique représentant la 5-HT,
- le signal fluorimétrique lié au NADH.

Une possible interaction (de nature physico-chimique) entre la 5-HT et le NAD<sup>+</sup> pourrait être possible. *In vitro* le transfert de charge entre le NAD<sup>+</sup> excellent accepteur d'électron et la 5-HT (ainsi que le tryptophane), donneur d'électron a été mesuré [Cilento,1961]. Cette interaction pourrait entraîner une élévation du niveau du NADH consécutive à une augmentation de 5-HT. Le NADH/NAD<sup>+</sup> est présent essentiellement sous la forme de coenzyme liée à des protéines et son accessibilité peut être limitée. Cependant il est vraisemblable que cette interaction soit négligeable à cause du très faible niveau de la 5-HT comparé à celui du NAD<sup>+</sup>/NADH.

**Le signal fluorimétrique du NADH présente lors du PS:**

- une élévation au niveau du nRD pouvant correspondre à une augmentation de l'activité dendritique,
- une diminution au niveau du Cx sans doute liée à la baisse de l'activité unitaire.

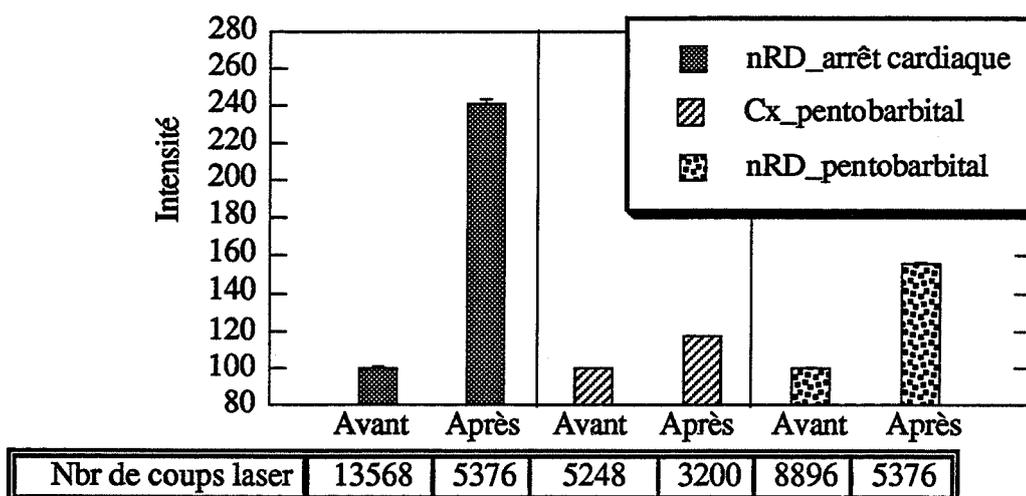
Les mesures fluorimétriques *in vivo* présentées ci-dessus essaient d'apporter des éléments originaux et constructifs face à la question concernant la nature des mécanismes non sérotoninergiques inhibiteurs des neurones du nRD lors du sommeil. La mesure fluorimétrique confirme les variations diachroniques (au niveau des terminaisons axonales) et synchroniques (au niveau du nRD) du sommeil mesurées par voltamétrie et liées à la 5-HT. Les variations du NADH sont plus difficiles à interpréter que celles d'un neurotransmetteur car ce composé intervient à plusieurs niveaux comme nous l'avons vu au début de ce chapitre. L'élévation du niveau de NADH pendant le PS peut être consécutive à une augmentation de la réduction du NAD<sup>+</sup> (élévation du niveau des substrats SH<sub>2</sub>) ou à une diminution de l'oxydation du NADH (chute de l'accessibilité à l'O<sub>2</sub> ou élévation du niveau d'ADP lié au stade de respiration mitochondriale).

### III.D.2. Etude de la variation du niveau du NADH lors de la mort de l'animal

Notre méthode permet une mesure *in vivo* du NADH; or les données de la littérature concernant les niveaux de concentration du NADH ont été réalisées de manière post-mortem. Il nous a semblé intéressant de mesurer les variations de NADH immédiatement après la mort de l'animal.

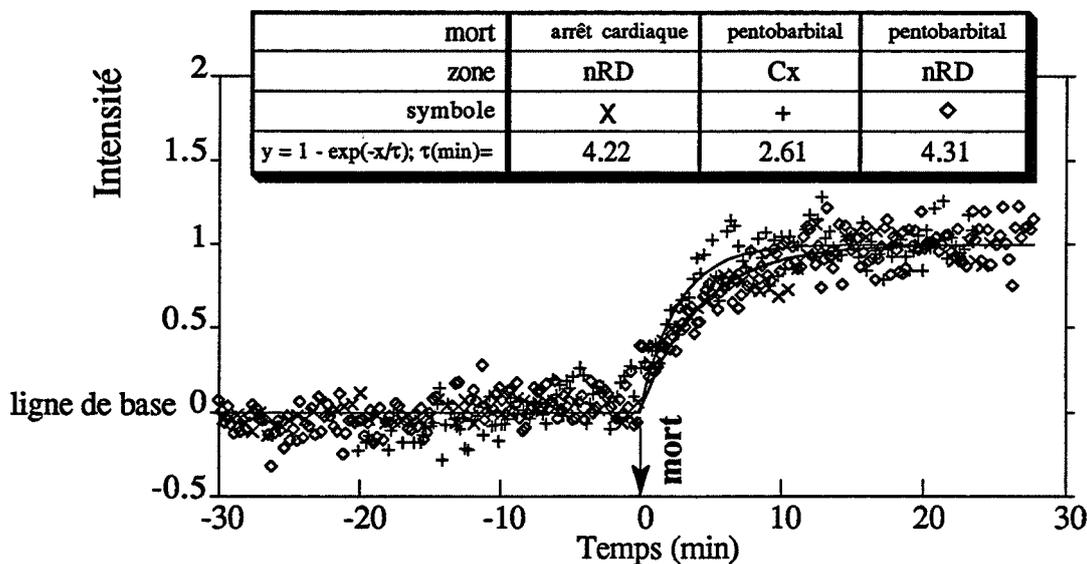
Les Figures III-28 et III-29 montrent les variations de la fluorescence du NADH *in vivo* consécutives à la mort de l'animal; une augmentation du signal est mesurée dans les quelques secondes qui suivent la mort. et la cinétique du phénomène est exponentielle. En choisissant un modèle de la forme  $1 - \exp(-t/\tau)$ , des temps de montée inférieurs à 5min ont été déterminés. En s'appuyant sur les études réalisées *in vivo* sur des animaux anesthésiés et ventilés (en normoxie, hypoxie et anoxie), l'analyse la plus pertinente consiste à relier l'augmentation brutale du niveau du NADH à l'anoxie consécutive à l'arrêt du système cardio-vasculaire [Chance,1962], [Chance,1965b], [Mayevsky,1982]. La brutale augmentation du niveau du NADH serait alors un reflet de l'absence brutale d'oxygénation.

Cependant au vu de ces résultats et de la rapidité des effets de la mort, il faut souligner qu'une réserve est nécessaire vis à vis des méthodes de mesures post-mortem.



**Figure III-28:**

Variation de la fluorescence mesurée à 460nm consécutive à la mort (n=3; moyennes du signal exprimées en % par rapport au niveau de base avant la mort fixé à 100%; la moyenne du signal après la mort (temps 0) est prise sur l'intervalle de temps [15', 30'])



**Figure III-29:**

Cinétique de la variation de la fluorescence mesurée à 460nm consécutive à la mort pour trois animaux (les moyennes du niveau avant la mort et après la mort (intervalle [15', 30']) sont fixées respectivement à 0 et à 1)

### III.D.3. Expériences pharmacologiques chez l'animal libre non anesthésié

#### III.D.3.a. Influence du métabolisme général par un assaut insulinique

Au niveau de la littérature les expériences réalisant la mesure fluorimétrique *in vivo* du NADH sont :

—l'hypoxie/anoxie par insuflation d'azote pendant quelques dizaines de secondes [Chance,1962], [Harbig,1976], [Mayevsky,1982],

—le coma hypoglycémique extrême par administration d'insuline. Cette manipulation entraîne la disparition de l'activité électrique corticale pendant trois minutes environ (EEG isoélectrique). Cette situation peut-être rapidement antagonisée par injection de glucose [Bryan,1983], [Bryan,1986], [Uematsu,1989]. La réalisation de cette situation expérimentale nécessite cependant des animaux ventilés artificiellement et anesthésiés. Nous avons constaté, en effet, chez l'animal en conditions chroniques qu'un assaut insulinique ne permet pas l'obtention de l'état isoélectrique du cerveau, la mort de l'animal survenant rapidement.

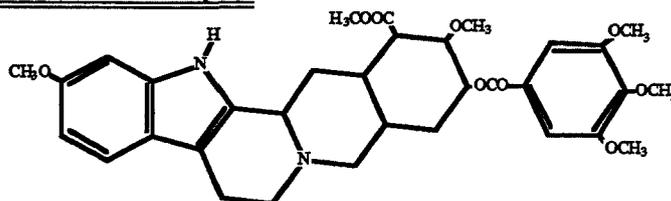
#### III.D.3.d. Substances intervenant sur le métabolisme sérotoninergique

A titre prospectif, nous avons choisi quelques molécules récentes qui interviennent à différents niveaux du métabolisme sérotoninergique:

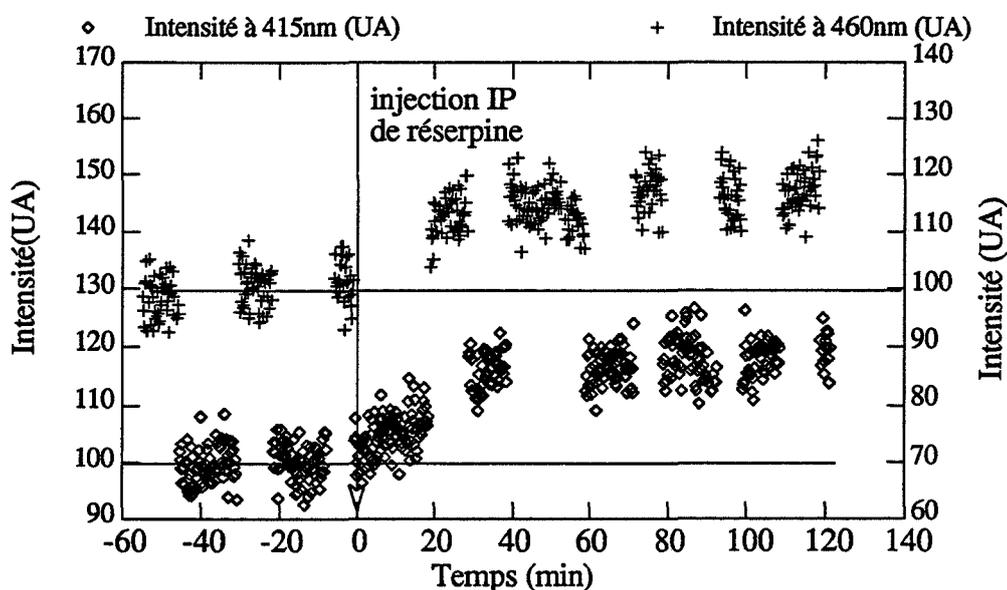
- la réserpine,
- les inhibiteurs de recapture de la 5-HT (molécule utilisée: la sertraline),
- les activateurs de la recapture post-synaptique et de la libération pré-synaptique de la 5-HT (molécule employée: la tianeptine).

**III.D.3.d.i. La réserpine**

La réserpine:



La réserpine (2,4,5-Trimethoxybenzoyl-methyl-reserpat) est une molécule qui agit sur toutes les neurones aminergiques en assurant une déplétion des transmetteurs qu'ils contiennent [Plescher,1962], [Grabarits,1966], [Reinhard,1988]. Ses mécanismes d'action précis reste encore controversés. Il est cependant probable que la déplétion des monoamines qu'elle provoque par dégranulation des vésicules, entraîne d'abord un enrichissement en amines du compartiment cytoplasmique intracellulaire.

**Figure III-30:**

**Cinétique de la variation de la fluorescence du nRD mesurée à 415nm et à 460nm consécutive à l'injection en IP de réserpine 20mg/Kg (les moyennes du niveau avant l'injection sont fixées à 100%; chaque point représente une moyenne sur 960 coups laser avec un temps de 10s).**

Les expériences que nous avons réalisées sur 3 animaux indiquent que les variations de la fluorescence à 415 et 460 nm, après administration (IP) de réserpine, sont assez analogues (Figure III-30). Les deux signaux augmentent puis se stabilisent 30 min, environ après injection.

La similitude des cinétiques des deux effets est assez troublante. Chaque cinétique pourrait cependant dépendre de mécanismes très différents.

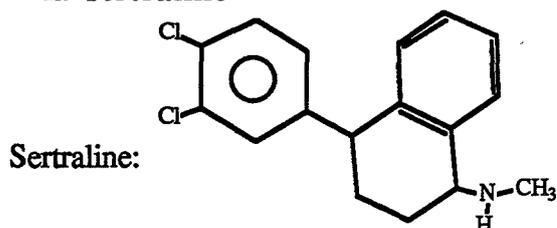
Ainsi l'augmentation du signal mesuré à 460nm (NADH) pourrait résulter: —soit d'une augmentation de la forme liée (plus fluorescente) de ce composé dans le compartiment cytoplasmique intracellulaire; —soit d'une augmentation de la synthèse de

*novo* dans ce même compartiment, synthèse consécutive du déséquilibre de la chaîne respiratoire induit par la réserpine.

L'augmentation du signal observé à 415nm pourrait dépendre des composés 5-OHs sous forme libre pour la 5-HT, mais présent dans ce cas dans les compartiments intra et extracellulaire.

### III.D.3.d.ii. Substances à propriétés antidépressives (sertraline et tianeptine)

—la sertraline



Cette substance, comme la réserpine, induit une augmentation mesurable des signaux à 415 et 460 nm. L'augmentation du signal mesuré à 415 nm semble cependant plus précoce que celle du signal à 460 nm ( Figure III-31)

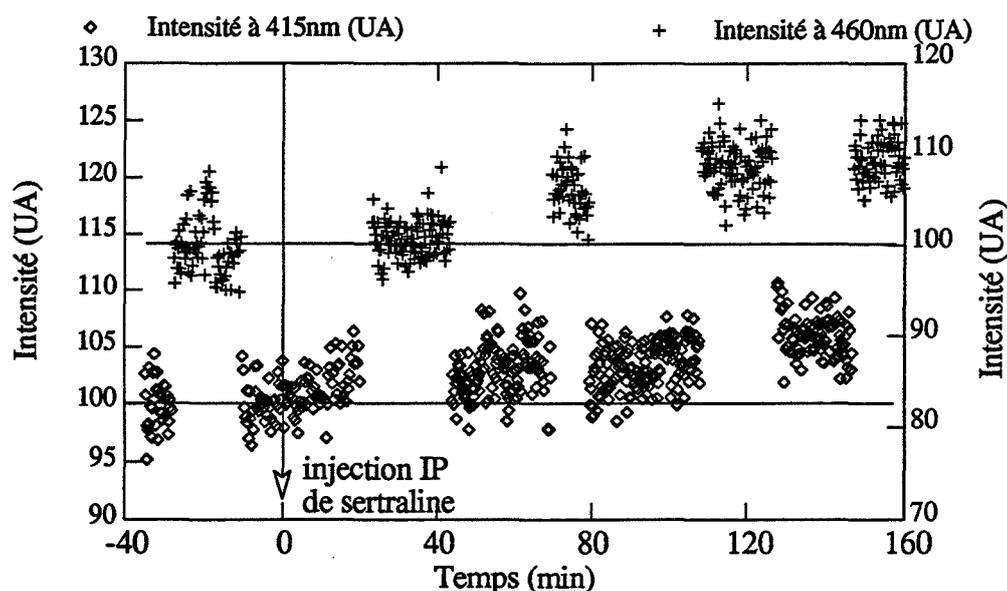


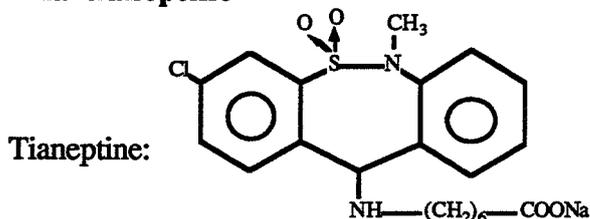
Figure III-31:

Cinétique de la variation de la fluorescence du Cx mesurée à 415nm et à 460nm consécutive à l'injection en IP de sertraline 10mg/Kg .

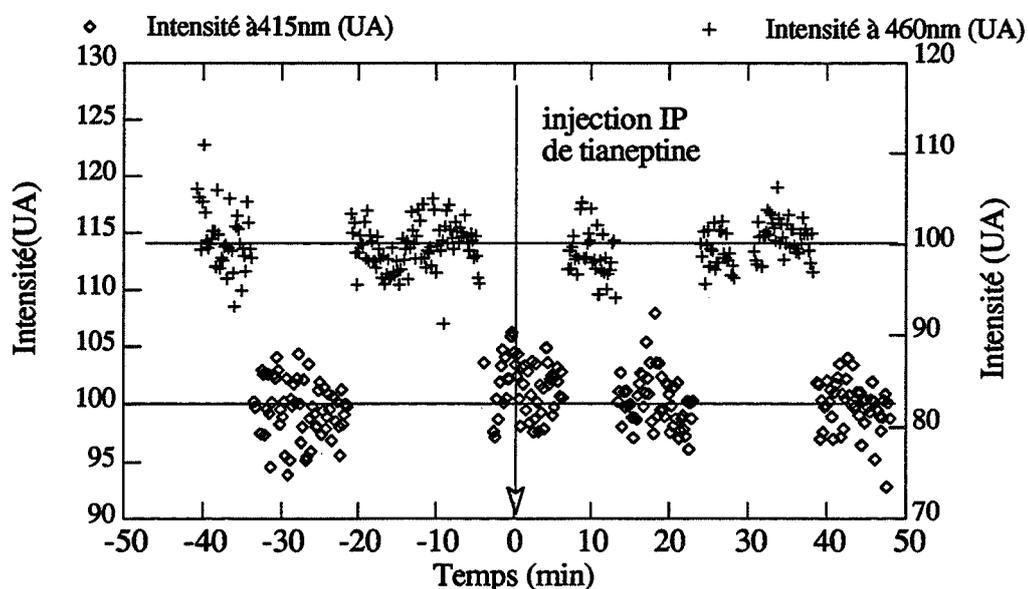
Dans cette situation pharmacologique, il est possible que l'augmentation du signal à 415 nm puisse résulter d'une augmentation extracellulaire de la 5-HT. Nous savons, en effet, par les données de la voltamétrie et de la dialyse, que cette catégorie de molécules entraîne une augmentation de la 5-HT extracellulaire sans variations du contenu endogène [Marinesco,1993]. La variation plus tardive du signal mesuré à 460 nm (NADH

intra-neuronal), pourrait résulter de perturbations d'ordre général conséquentes à l'effet de la sertraline (métabolisme, circulation, température...etc).

—la tianeptine



Cette substance n'entraîne pas de variations significatives des signaux correspondant aux pics d'émission à 415 et 460 nm (Figure III-32).



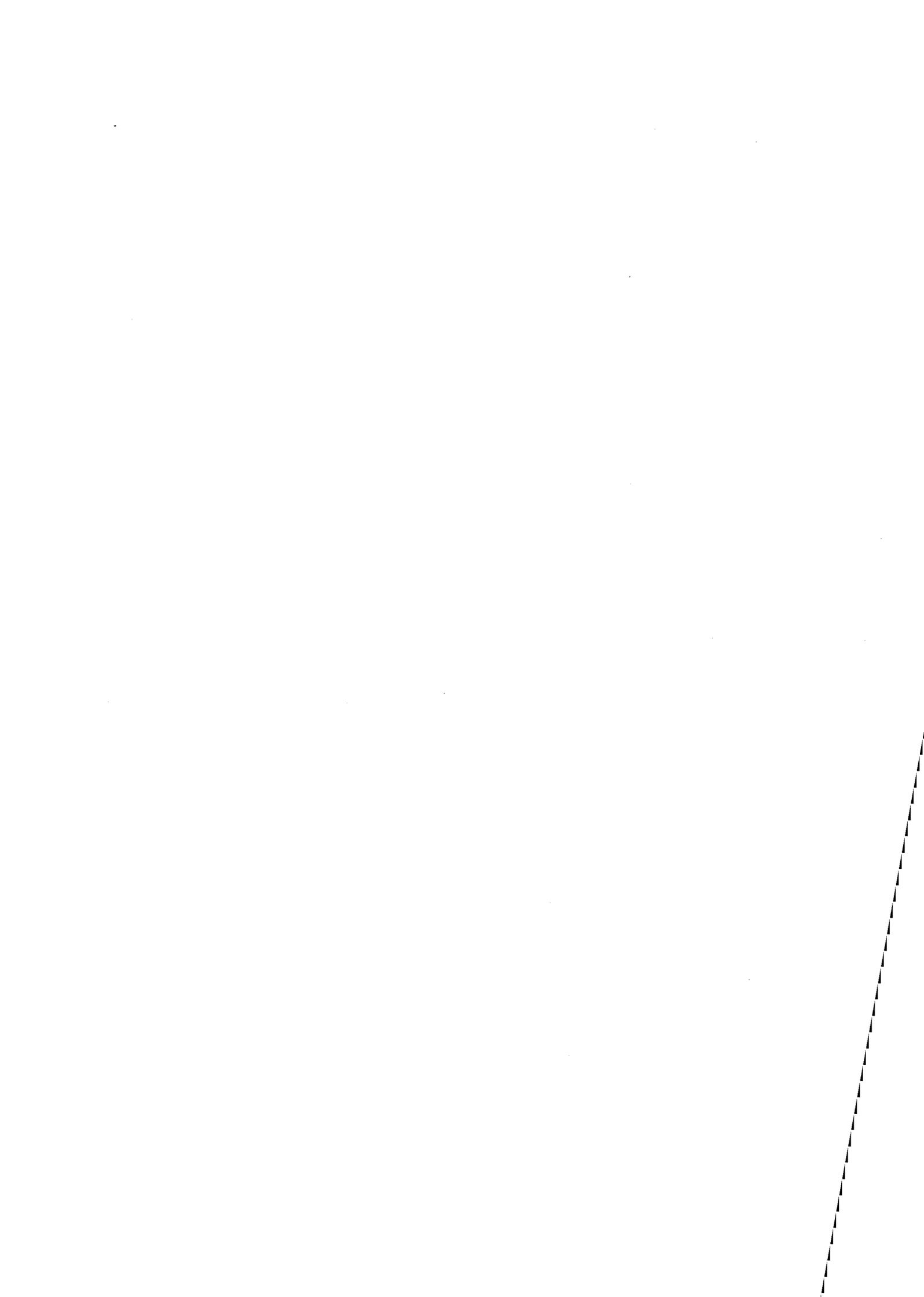
**Figure III-32:**

Cinétique de la variation de la fluorescence du Cx mesurée à 415nm et à 460nm consécutive à l'injection en IP de tianeptine 10mgr/Kg.

Les mesures voltamétriques indiquent que la tianeptine entraîne une augmentation de 50% du signal 5-HIAA extracellulaire. Cette variation ne semble pas accompagnée de changement important, ou tout au moins mesurables, de la 5-HT endogène ou extracellulaire [Marinesco,1993]. Il est vrai que cette molécule est rapportée pour induire des effets plus "doux" que ceux de la sertraline ou des autres inhibiteurs de la recapture.

---

L'ensemble de ces données, nous suggère donc que les mesures réalisées à 415 et 460 nm avec le FOCS pourraient dépendre respectivement de la 5-HT (soit intra ou extracellulaire) et du NADH (essentiellement intracellulaire). Nous insistons sur le fait qu'une telle interprétation peut être provisoire car établie sur des données préliminaires. Au stade expérimental auquel nous sommes arrivés, il est clair que la difficulté d'évaluation du compartiment où se font les mesures, est une limitation importante du FOCS présenté. Malgré cette difficulté, la situation vis à vis du signal à 460nm, dépendant majoritairement du NADH intracellulaire (évidences anatomiques et biochimiques de la littérature), est plus facile à appréhender. Pour cette raison, le travail de recherche présenté ici a été plus orienté vers ce dernier signal. La situation n'est cependant pas figée à cet état des choses, des capteurs semi-intrinsèques, permettant d'aller au delà de cette difficulté, sont actuellement à l'étude. Ils sont évoqués dans les perspectives et la partie annexe qui suit.



## **Chapitre IV:**

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



## IV. Conclusions et Perspectives

### Conclusions

La recherche exposée ci-dessus concerne la conception et la mise au point d'un microcapteur à fibre optique ( $\varnothing=200\mu\text{m}$ ) permettant la mesure résolue en temps et en longueur d'onde de la fluorescence induite par laser émise par des substances cérébrales spécifiques. Nous nous sommes orientés vers la neurobiologie et plus précisément vers la compréhension des mécanismes neurochimiques qui sous-tendent l'alternance éveil-sommeil.

Sur le plan technique, notre approche est sans équivalent. Elle est orientée vers la recherche d'une technologie alternative de la voltamétrie et préservant certaines qualités:

- taille submillimétrique du capteur,
- facilité de préparation du capteur (moins de 5 min),
- mesure rapide (inférieure à la minute),
- mesure en conditions chroniques avec l'animal libre de tous mouvements.

Son intérêt se situe sur divers plans:

- le capteur proposé n'est pas destructif ,
- il n'est pas non plus invasif car il peut être implanté sur la boîte crânienne d'un rat et laissé à demeure dans des conditions chroniques (animaux libres de tous mouvements) pendant plusieurs semaines,
- au delà de la qualité physiologique des mesures réalisées, l'intérêt de leur spécificité est importante, cet aspect est également acquis. En effet par usage de stimulations laser adéquates (en l'occurrence laser azote émettant à 337nm) et d'analyse spectrale de la fluorescence, il a été possible de détecter *in vivo* à 460nm une fluorescence liée majoritairement au NADH endogène. La mesure d'un tel composé n'est pas actuellement réalisable *in vivo* par d'autres méthodes.

### Perspectives

Les perspectives de la présente recherche, toujours sur le plan technique, sont orientées vers l'élargissement des potentialités du capteur proposé.

Ainsi l'acquisition d'un ensemble laser accordable pouvant délivrer des stimulations à des longueurs d'onde de 250 à 337nm devrait susciter de façon spécifique la fluorescence d'autres composés endogènes. Dans ce contexte la fluorescence émise par les composés 5-OH en particulier la sérotonine, semble potentiellement accessible.

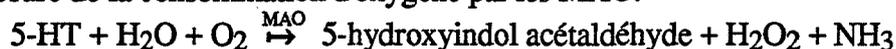
Des ouvertures vers d'autres domaines d'application du microcapteur déjà opérationnel sont aussi à l'étude:

- Mesure du NADH en radiobiologie en collaboration avec le Centre de Recherche des Services de Santé des Armées de Grenoble,
- Mesure du NADH pour le suivi de la vie cellulaire et de la conservation d'organes,
- Mesure du NADH in situ dans des bioréacteurs et fermenteurs,
- Mesure du NADPH chez les végétaux supérieurs en vue de détecter des niveaux d'herbicides [Cerovic,1993].

Les applications de cette nouvelle technologie ne restent cependant pas limitées aux possibilités évoquées ci-dessus. Nous envisageons aussi l'association en bout des fibres optiques d'une couche sensible composée d'agents fluorescents couplés avec des enzymes ou d'autres substances. La réalisation de ces couches, sensibles à des substances d'intérêt biologique premier (neurotransmetteurs, neuromodulateur, substances hypnogènes, glucose...), sera le prochain objectif scientifique de cette recherche.

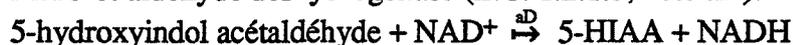
Pour les corps comme la sérotonine, deux voies de mesure par FOCS semi-intrinsèque peuvent être retenues [Guilbault,1976]:

- mesure de la consommation d'oxygène par les MAO:



- mesure de la production de NADH par l'intermédiaire du couple enzymatique

MAO et aldéhyde déshydrogénase (E.C. 1.2.1.3, noté aD):

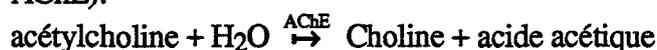


Pour ces techniques la sélectivité des MAO vis-à-vis de la 5-HT reste critique. La recherche d'enzyme ou d'autres réactifs régénérables présentant une spécificité vis-à-vis de la 5-HT est à soutenir vivement. La solution la plus élégante serait de rechercher un fluorophore capable de réaliser un transfert de charge sélectif avec la 5-HT.

En outre nous avons vu au chapitre précédent que le compartiment intracellulaire contribue notablement à la mesure de la 5-HT avec notre FOCS. Or c'est la mesure de cette amine dans le compartiment extracellulaire qui est intéressante. La réalisation d'un capteur mesurant la 5-HT dans ce seul compartiment reste néanmoins possible. Il nécessite une membrane opaque, non fluorescente et perméable à la 5-HT disposée en bout de FO. En tenant compte des données photophysiques de la 5-HT, un laser accordable de 280-325nm est aussi nécessaire afin d'obtenir le meilleur signal possible.

Pour la mesure de l'acétylcholine par FOCS, diverses voies s'offrent devant nous:

—mesure de pH par l'intermédiaire de l'acétylcholinestérase (E.C. 3.1.1.7. noté AChE):



—mesure de  $p\text{O}_2$  par l'intermédiaire de l'AChE et de la choline oxydase,

—adaptation de méthodes fluorimétriques post-mortem de production multienzymatique de NADH [Guilbault,1976].

Seule la première technique permet de mesurer l'acétylcholine, les autres méthodes mesurant la somme de la choline et de l'acétylcholine.

En outre en vue d'une utilisation *in vivo*, les sources d'interférences des capteurs à  $p\text{O}_2$  doivent être soulignées. L'une d'entre elles est l'oxygène lui-même. La sensibilité aux fluctuations physiologiques de la  $p\text{O}_2$  sera donc à considérer.

Dernièrement a été publiée une technique mettant en œuvre des phénomènes de transfert d'énergie et suggérant la mesure de composés chimiques (pH,  $p\text{CO}_2$ , glucose) par des méthodes d'acquisition de temps de fluorescence, sans la transduction de l'oxygène. Cette méthode pourrait convenir pour la mesure de l'acétylcholine [Lakowicz,1993a], [Lakowicz,1993b], [Thompson,1993b], [Szmactinski,1993].

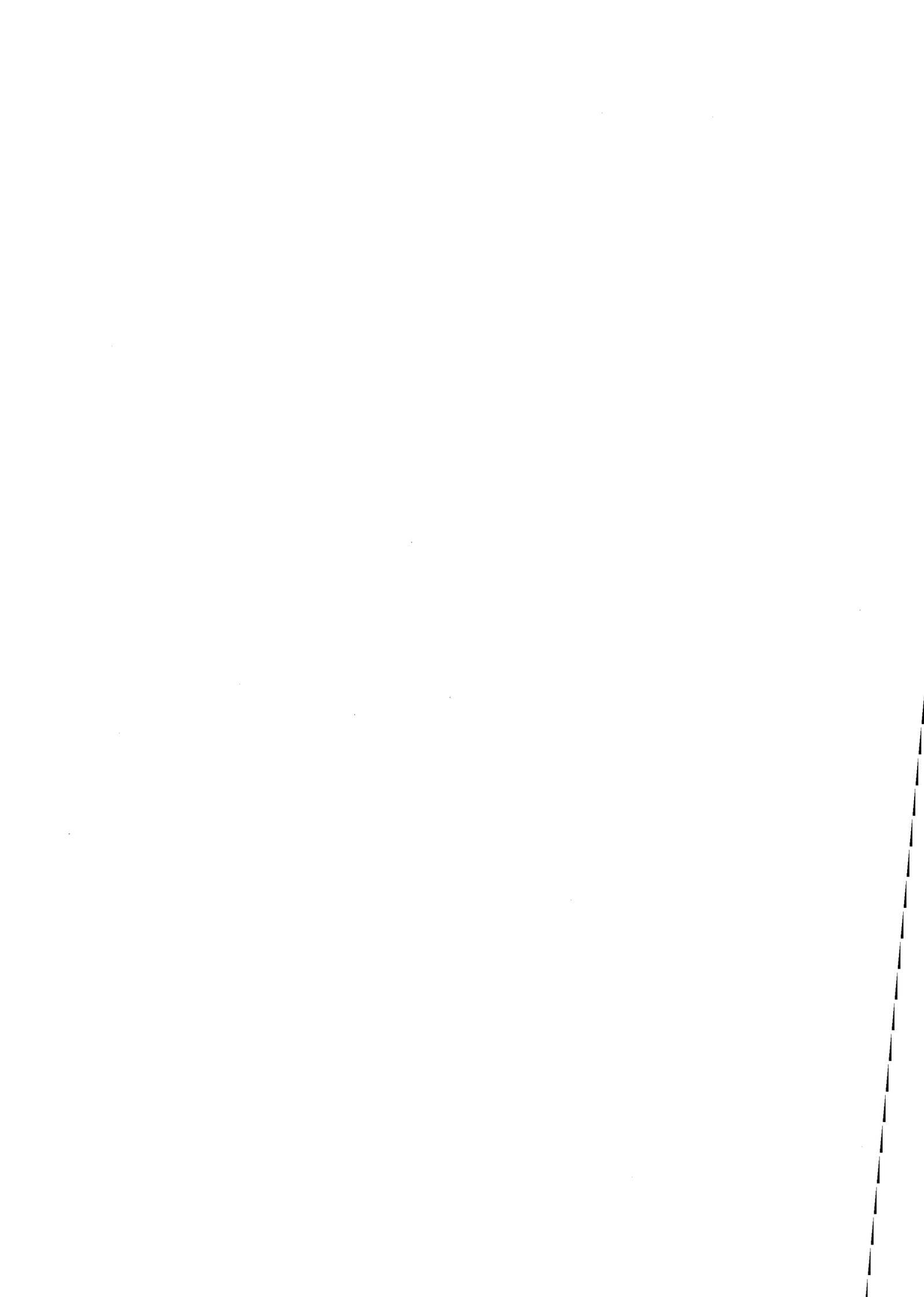
De plus nous avons placé en annexe, les expériences déjà réalisées qui montrent la faisabilité:

- d'un FOCS avec un laser différent du laser azote (laser YAG) émettant dans l'UV à 266nm,
- de la mesure de l'oxygène *in vitro*.

L'ensemble des mesures évoquées ci-dessus et qui sont actuellement réalisables ou de mise en œuvre possible, peuvent être associées à la détection polygraphique des états de vigilance. Une telle approche, d'un intérêt scientifique indéniable, pourrait ouvrir des voies de recherche nouvelles utiles pour une meilleure compréhension des multiples mécanismes qui induisent ou régulent le sommeil.



# ANNEXE

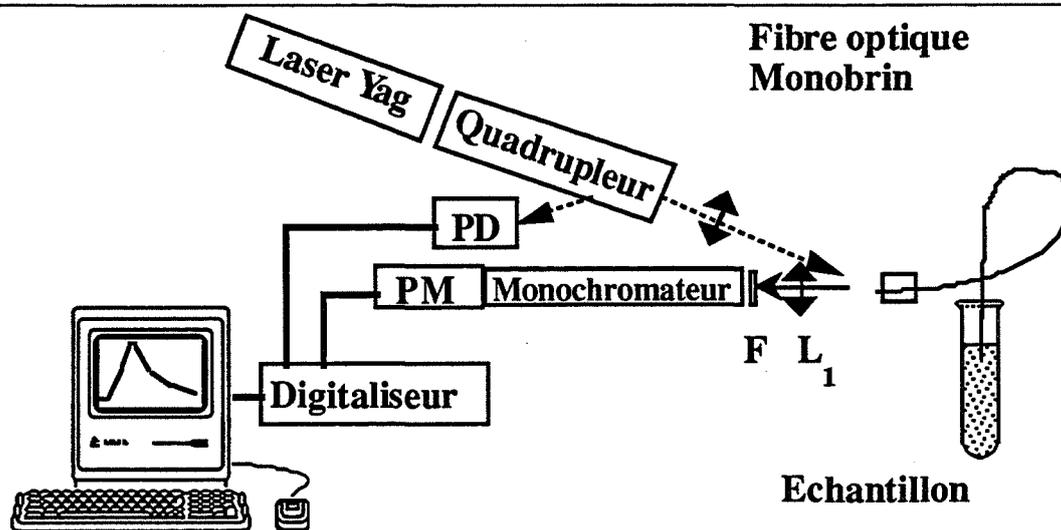


## Annexe

### Aspect technique

Afin d'estimer les difficultés techniques relatives à la conception et à la réalisation d'un appareillage de deuxième génération utilisant une excitation UV dans la gamme 250 à 337 nm, nous avons mis en œuvre une source laser YAG nanoseconde quadruplé (longueur d'onde d'émission: 266 nm) disponible au sein du laboratoire TSI. Pour cela une fibre optique "spécial UV" de diamètre de 200 $\mu$ m présentant une atténuation deux à trois fois moindre que les fibres PCS dans le domaine 180-300 nm a été utilisée. Parmi les fibres disponibles, le modèle Optran UV quartz/quartz de la société CeramOptec Inc., Bonn, présente la plus faible fluorescence sous excitation à 266nm. Son ouverture numérique est de 0.2. Les diamètres de cœur sont compris entre 50 $\mu$ m (diamètre cladding minimum de 125 $\mu$ m) et 1500  $\mu$ m. Elle est de plus stérilisable par radiation gamma. Pour ces essais préliminaires nous avons utilisé 3mètres de fibre.

La Figure IV-1 montre les différents éléments de l'appareillage mis en œuvre pour une excitation à 266nm. L'injection du laser et la récupération de la fluorescence sont réalisées par une géométrie adaptée et une optimisation des deux lentilles. Ce dispositif permet de s'affranchir d'un élément optique important existant dans le précédent appareil: le miroir dichroïque. Cependant, les deux inconvénients de ce montage sont une injection biaisée et une perte importante du signal de fluorescence collecté par la fibre.

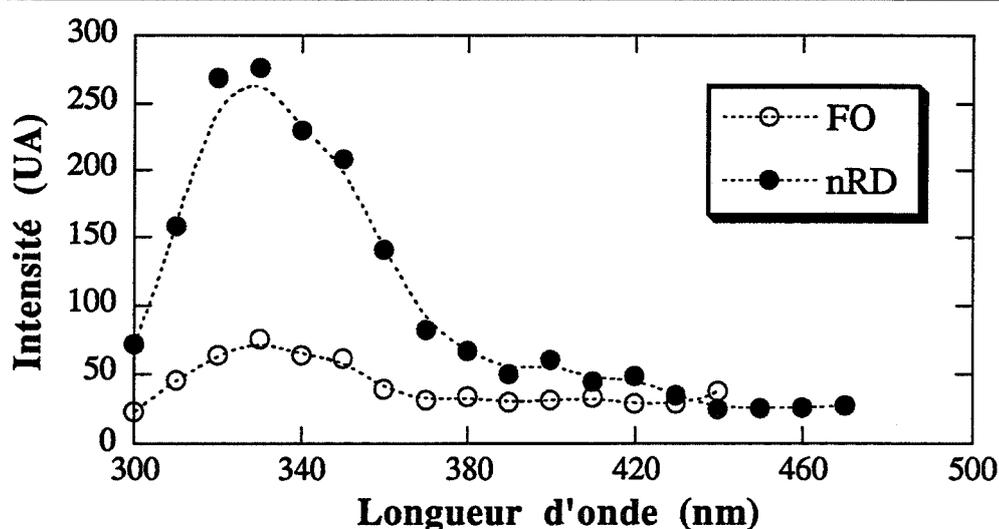


**Figure IV-1: Schéma de l'appareil**  
 (en trait pointillé: flux du laser à 266nm; en trait plein: fluorescence; L: lentille de focalisation; F: filtre passe haut pour diminuer le 266nm; PD: photodiode; PM: photomultiplicateur).

## Aspect appliqué

### Faisabilité de la mesure cérébrale in vivo avec une excitation à 266nm

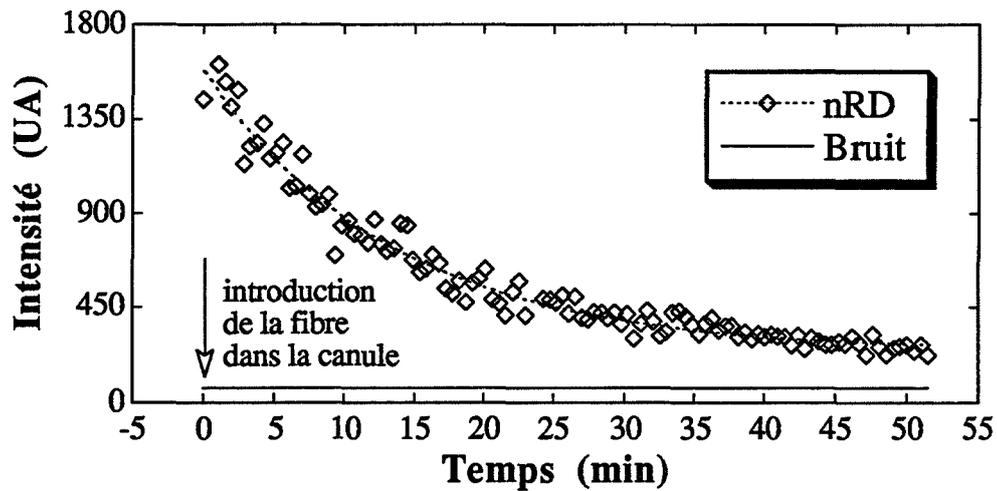
La Figure IV-2 présente des données spectroscopiques préliminaires relatives à la fluorescence de la fibre utilisée et du nRD. La résolution spectrale est de  $\pm 4\text{nm}$ . L'échelle de temps est fixée égale à 5 ns/div afin de couvrir l'ensemble du pic temporel de fluorescence (sa forme est déterminé par l'enveloppe temporelle du YAG).



**Figure IV-2:**  
Spectres d'émission de la fibre nue dans de l'eau milliQ et du nRD  
chez le rat avec une excitation à 266nm

La largeur à mi-hauteur de l'excitation laser du YAG à 266nm est de 12ns. L'intégrale de la fluorescence est reportée en ordonnée sur la Figure IV-2 en unité arbitraire. Nous constatons l'absence du pic du NADH situé à 460nm. Par contre un autre pic dont le maximum est à 330nm est bien présent. Ce pic couvre la zone spectrale de 300-380nm.

De plus nous nous sommes intéressés à la cinétique de la fluorescence du pic situé dans la zone des 300-380nm lors de l'introduction de la FO dans la canule. La Figure IV-3 présente un résultat préliminaire concernant cette cinétique. Le même phénomène de décroissance exponentielle apparaît suite à l'introduction de la FO dans la canule. Lors de l'excitation à 337nm et du suivi du NADH à 460nm, nous avons enregistré une cinétique semblable (voir le sous-chapitre "Spectroscopie Uv-Vis de l'autofluorescence du tissu cérébral dans deux structures" ). Sur cet enregistrement préliminaire le temps de décroissance exponentielle est de  $13.5 \pm 0.6\text{min}$ .



**Figure IV-3:**

Décroissance de la fluorescence du nRD *in vivo* à la longueurs d'onde d'émission de 350nm sous excitation à 266nm et consécutive à la première insertion de la FO dans la canule  
 (en pointillé, est reporté l'ajustement par les moindres carrés de l'exponentielle décroissante de temps de 13.5min;  
 le bruit de la FO est donné en trait plein)

Ces données préliminaires, réalisées avec une résolution temporelle réduite, suggèrent la possibilité d'enregistrer des spectres et des cinétiques *in vivo* chez le rat libre de tous mouvements sous une excitation à 266nm. L'appareil de deuxième génération devrait permettre outre l'accordabilité entre 250nm et 337nm et une résolution subnanoseconde, une meilleure statistique de comptage de photo-électron et un enregistrement de cinétique à plusieurs longueurs d'onde simultanément. Ces potentialités ouvrent un champ de recherche totalement vierge. Cependant un élément limitant s'affirme, étant donné la relative largeur des spectres d'absorption dans l'UV des molécules endogènes, seuls quelques composés chimiques seront accessibles au capteur extrinsèque. Pour s'affranchir de cette limite il faudra passer du capteur extrinsèque au capteur semi-intrinsèque.

### Microcapteur semi-intrinsèque à fibre optique

La conception et la réalisation d'une couche sensible à un composé chimique et de son immobilisation en bout de fibre optique relève de deux spécialités:

- le génie des matériaux luminescents,
- et le génie du dépôt en particulier sur verre ("coating engineering").

Le passage du capteur à fibre optique *in vivo* extrinsèque au capteur semi-intrinsèque nécessite:

- le savoir faire concernant la réalisation d'une couche sensible homogène et reproductible,
- la vérification de la non toxicité et de la bio-compatibilité,
- le contrôle de la stabilité de la membrane au cours du temps (problèmes d'exsudation, de photolyse...).

L'ensemble de ces conditions entraîne une nécessaire approche pluridisciplinaire.

Les paramètres que nous désirons mesurer pendant les stades de veille-sommeil sont en premier lieu:

- l'oxygène, le glucose,
- certains neurotransmetteurs comme l'acétylcholine, la sérotonine...

La perspective la plus probable à court terme est la réalisation d'un capteur à fibre optique semi-intrinsèque à oxygène. Outre la mesure de l'O<sub>2</sub>, cette nouvelle génération de capteur est susceptible d'ouvrir la voie à la mesure de plusieurs centaines de composés biochimiques (glucose, lactate, éthanol, glutamate...) par l'intermédiaire d'enzymes, en particulier les oxydases qui utilisent l'oxygène comme accepteur (dans la nomenclature internationale des enzymes elles sont notées E.C. 1.x.3.y. avec x comme nombre entier caractérisant le groupe donneur) [Guilbault,1976]. La mesure de l'acétylcholine et de la sérotonine pourrait être réalisée par des ensembles multienzymatiques.

### Aspect bibliographique

La recherche sur les capteurs à fibre optique à visée *in vivo* peuvent être classés dans cinq grands domaines d'application [Silberman,1988], [Seitz,1988], [Wolfbeis,1988], [Collison,1990], [Thompson,1991]:

- capteur pO<sub>2</sub> [Kroneis,1983], [Peterson,1984b], [Gehrich,1986], [Wolfbeis,1986], [McFarlane,1987], [Miller,1987], [Peterson,1987], [Vickers,1987], [Lippitsh,1988], [Wolfbeis,1988b], [Trettnak,1989], [Lieberman,1990], [MorenoBondi,1990], [Schaffar,1990], [Gewehr,1993], ainsi que les membranes sensibles à l'oxygène [Lübbbers,1983],

- [Wolfbeis,1984], [Cox,1985], [Parker,1986], [Bacon,1987], [Opitz,1987], [Carraway,1991b],
- capteur pH (en incluant pCO<sub>2</sub>) [Peterson,1980], [Janata,1992], [Liu,1992], [Tan,1992], [Lakowicz,1993b], [Szmactinski,1993], [Thompson,1993b]
  - capteur ionique (K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>...) [Alcock,1992], [Thompson,1993a],
  - capteurs de glucose [Schultz,1985], [Parker,1986], [Opitz,1987], [Trettnak,1988], [Schaffar,1990], [MorenoBondi,1990], [Lakowicz,1993a],
  - capteurs d'autres composés d'intérêt clinique.

L'importante littérature sur les capteurs pO<sub>2</sub> à fibre optique témoigne d'un engouement certain; celui-ci est en partie lié aux avantages des capteurs optiques par rapport aux capteurs électrochimiques [Suzuki,1990]:

- petite taille,
- absence de consommation d'oxygène,
- indépendance vis-à-vis de la mécanique des fluides proche du capteur (agitation, bulles...).

Le premier FOCS à pO<sub>2</sub> implanté date du début des années 80 [Peterson,1984b]. Il mettait en œuvre un indicateur coloré dont le spectre d'absorption change en fonction de pO<sub>2</sub>. La stabilité nécessaire ne put cependant pas être atteinte de manière satisfaisante [Peterson,1987].

Toujours pour la réalisation d'un capteur pO<sub>2</sub> *in vivo*, une autre technique a été utilisée: l'inhibition dynamique de fluorescence de certains fluorophores entraînée par la présence de l'oxygène [Gehrich,1986], [Miller,1987], [Peterson,1987]. Nous avons déjà vu ce phénomène au chapitre MESURE *IN VITRO* DE LA SÉROTONINE à propos du standard PPO. Ce phénomène est purement collisionnel: plus la pO<sub>2</sub> est importante, plus le nombre de collisions avec le fluorophore est grand. Pendant ces collisions un transfert d'énergie s'opère, entraînant une chute de l'intensité de fluorescence et du temps de déclin de fluorescence apparent [Kearns,1971], [Birks,1970]. Il faut retenir que cette méthode permet de mesurer l'oxygène sans le consommer mais en le transformant en oxygène singulet excité relativement réactif [Carraway,1991b]. La forme mathématique de l'inhibition dynamique de fluorescence monoexponentielle par un seul inhibiteur, en l'occurrence ici l'oxygène, est appelée équation de Stern-Volmer (dernièrement cette relation a été généralisée pour des cas plus complexes [Green,1993]):

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [O_2] = 1 + K_d [O_2] = 1 + K_d \alpha pO_2$$

I<sub>0</sub> et I sont les intensités de fluorescence en l'absence et en présence d'O<sub>2</sub>; τ<sub>0</sub> et τ sont les temps de déclin monoexponentiel apparent en l'absence et en présence d'O<sub>2</sub>; pO<sub>2</sub> est

la pression partielle en oxygène;  $\alpha$  est le coefficient de solubilité de l'oxygène ( $[O_2] = \alpha pO_2$  n'est valable que si la solubilité est constante dans le milieu);  $k_q$  est la constante de vitesse d'une réaction limitée par la diffusion donc en  $(l \text{ mole}^{-1} \text{ s}^{-1})$ ;  $k_q = 4\pi\gamma DR \frac{N}{1000}$  avec  $\gamma$  l'efficacité de l'inhibition ( $\gamma=1$  si à chaque collision il y a transfert d'énergie vers l'oxygène),  $D$  la somme des coefficients de diffusion du fluorophore et de l'oxygène,  $R$  la somme des rayons du fluorophore et de l'oxygène et  $N$  le nombre d'Avogadro [Vaughan,1970]. Les valeurs de  $k_q$  sont de l'ordre de  $25 \cdot 10^9 \text{ l mole}^{-1} \text{ s}^{-1}$  en solution liquide à température ordinaire, les temps de fluorescence  $\tau_0$  sont eux compris entre 1 et 100ns, ce qui donne une pente  $K_d$  de 25 à 2500  $\text{l mole}^{-1}$ .

Pour le naphthalène dans du cyclohexane à 25°C le rapport des temps ( $\frac{\tau_0}{\tau}$ ) est de 6.4 avec  $\tau$  mesuré pour une solution saturée en oxygène c'est-à-dire en équilibre avec l'air à 1 atm (20% d'oxygène) [Berlman,1971]. Pour d'autres fluorophores habituellement ce rapport s'établit entre 1 et 2.5. En outre l'oxygène est moins soluble en solution aqueuse: la concentration en oxygène dissous dans du plasma *in vivo* est comprise entre 0 et 0.4 mM (à saturation) [Parker,1986].

Du fait d'une plus grande simplicité et d'un appareillage moins coûteux, les premiers capteurs  $pO_2$  développés se sont contentés de la seule mesure de l'intensité de fluorescence [Kroneis,1983], [Wolfbeis,1988b]. Les limitations de cette technique sont: —les dérives du signal et de la référence dues aux variations de la source lumineuse et de l'électronique ainsi qu'à la photodécomposition et la stabilité dans le temps de la membrane, —la dépendance du niveau de fluorophore dans la couche sensible, —l'intervention de fluorescences parasites (autres que celle du fluorophore sensible à l'oxygène), —la sensibilité aux phénomènes parasites comme la diffusion et l'absorption.

Pour contourner ces limites un autre fluorophore, insensible à l'oxygène et émettant à une longueur d'onde différente de celle du fluorophore sensible, est rajouté dans la membrane afin d'atteindre une plus grande fiabilité du capteur [Gehrich,1986], [Peterson,1987]. Des fluorophores présentant deux bandes d'émission l'une sensible à l'oxygène et l'autre non, ont fait l'objet d'études en vue de réaliser un capteur ratiométrique [Lee,1987].

Malgré les limites du monofluorophore et de la mesure de la seule intensité de fluorescence, différentes réalisations de biocapteurs enzymatiques (à lactate et à glucose) *in vitro* ont été publiées [Trettnak,1989], [Schaffar,1990], [MorenoBondi,1990]. La reproductibilité de ces biocapteurs sur quatre semaines a été démontrée [MorenoBondi,1990]. La stabilité à long terme (sur 25 semaines) a été aussi étudiée [Schaffar,1990].

Une deuxième génération de capteurs et d'appareillages associés, utilisant l'intensité de fluorescence et le temps de fluorescence comme signaux mesurant l'oxygène, est apparue dès 1987 [Bacon,1987], [Lippitsh,1988]. Les recherches concernant l'instrumentation et les membranes sensibles utilisées (mesure de temps de fluorescence ou de phosphorescence) sont encore d'actualité [Lakowicz,1993a], [Gewehr,1993].

Le point sur lequel il reste encore beaucoup d'investigations se révèle être les choix du fluorophore et de la membrane [Peterson,1984b], [Wolfbeis,1988], [Carraway,1991b]. Berlman a classé les différents fluorophores utilisés en scintillation en fonction de leur sensibilité à l'inhibition par l'O<sub>2</sub> [Berlman,1971]. En fonction des données spectrales des FO (faibles atténuations) la majorité des auteurs se sont limités au visible et le proche IR [Wolfbeis,1988]. Avec cette limite une grande majorité de fluorophores sont éliminés. Le fluorophore idéal présenterait donc (1) une excitation dans le visible, (2) une émission avec un décalage important vers le rouge, (3) une bonne photostabilité, (4) une non-toxicité, (5) une sensibilité à l'oxygène la plus élevée, (6) une absence d'interférence en particulier avec l'eau et NH<sub>3</sub>. En fonction de ces critères, ces auteurs ont sélectionné trois types de fluorophores:

- des aromatiques polycycliques comme le pérylène dibutyrate, le décacyclène, l'acide pyrènebutyrique, le 9.10-diphénylanthracène..., avec comme inconvénient principal une excitation généralement dans l'UV,
- des complexes de ruthénium(II) comme le Ru(Ph<sub>2</sub>phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (avec Ph<sub>2</sub>phen = 4,5-diphényl-1,10-phenanthroline) ou le Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (tris(2,2'-bipyridine) ruthénium(II)), présentant le désavantage d'avoir un faible rendement quantique de fluorescence et d'être modérément sensibles à l'inhibition de fluorescence,
- des métalloporphyrines comme le Pd coproporphyrine utilisées en phosphorescence.

En ce qui concerne la membrane, elle doit présenter:

- des propriétés physico-chimiques de perméabilité et de solubilité à l'oxygène mais aussi de solubilité et de faible exsudation vis-à-vis du fluorophore ainsi que d'une relative imperméabilité à l'égard de possibles interférants présents *in vivo* et enfin une bio-compatibilité suffisante,
- des propriétés optiques adéquates (faible atténuation dans le domaine spectral d'excitation et d'émission du fluorophore, une faible autofluorescence, peu de photodécomposition),
- une facilité de fabrication (en particulier une bonne solubilité vis-à-vis des solvants utilisés pour la fabrication) et une reproductibilité suffisante.

Le choix de la membrane est très important car il détermine la sensibilité et le temps de réponse du capteur. En outre l'inhibition de fluorescence est encore plus prononcée

quand le fluorophore est adsorbé sur un corps solide. Cette donnée a entraîné l'utilisation de trois classes de supports pour le fluorophore:

- polymères organiques classiques,
- supports inorganiques solides,
- combinaison des deux.

L'inconvénient des adsorbants inorganiques est de rendre l'inhibition de fluorescence sensible à l'humidité [Peterson,1984], [Posch,1988]. En présence de 100% d'humidité la perte de la fluorescence est dramatique. La solution proposée par certains auteurs est d'englober des particules du support où le fluorophore est adsorbé par un polymère hydrophobe [Wolfbeis,1988b], [MorenoBondi,1990].

Les supports inorganiques qui donnent la plus grande efficacité de l'inhibition de fluorescence sont les silica gel. Des progrès récents en technologie des céramiques (procédés sol-gel) ont permis de fabriquer des verres poreux dit sol-gel à température ambiante et d'y incorporer des corps organiques [Makishima,1986], [Pope,1987], [Yamanaka,1991], [Kitamura,1991], [Lev,1992]. Les propriétés des silices poreuses paraissent très intéressantes pour des applications capteur car elles combinent: (a) une rigidité physique (résistance mécanique, continuité avec le quartz des FO); (b) un gonflement négligeable en solutions aqueuse et organique et une inertie chimique; (c) une grande stabilité photochimique et thermique; (d) une excellente transparence optique et une faible autofluorescence; (e) la facilité de mise en œuvre (fibres, blocs, films minces). Les principaux désavantages sont une certaine fragilité, une capacité d'échange cationique qui peut être importante due aux groupements silanol de la surface, et des procédures plus complexes d'immobilisation de composés organiques. La réalisation de film mince en bout de fibre peut être réalisée par les méthodes de trempage dite du "dip-coating", de "spin-coating" ou de "spraying" [Bahtat,1992]. Le "dip-coating" consiste à tremper l'embout d'un substrat dans la solution réactive et à le retirer à vitesse constante. Le "spin-coating" est un dépôt de goutte sur un substrat en rotation.

Au niveau des polymères organiques, la préférence revient aux membranes silicones qui satisfont l'ensemble des propriétés requises en particulier une solubilité et une perméabilité aux gaz supérieurs aux autres polymères [Cox,1985]. Le seul point faible réside dans la faible solubilité des fluorophores dans le silicone limitant le signal de fluorescence [Gewehr,1993]. Cependant un mélange de deux polymères différents peut conduire à des propriétés supérieures comme l'ont montré des mélanges silicone-PVC (PVC=poly(vinylchloride)) [Wolfbeis,1988].

La majorité des polymères utilisés sont hydrophobes et présentent une très faible perméabilité aux corps non volatils présents *in vivo* ceci a pour conséquence de protéger le fluorophore mais en même temps d'être limité, pour les développement de biocapteur, à déposer les enzymes à la surface de cette membrane. Pour s'affranchir de cette dernière

limite, un auteur a proposé un capteur à  $pO_2$  et à glucose avec un polymère hydrophile: le PHEMA (PHEMA=poly hydroxyéthyl méthacrylate) utilisé pour les lentilles de contact et dont l'hydratation atteint 35% [Parker,1986].

Des études théoriques concernant les membranes sensibles ont été aussi publiées (mécanismes d'inhibition en système hétérogène membrane silicone) [Carraway,1991], [Carraway,1991b].

A travers ce tour d'horizon qui couvre les dix premières années du domaine des FOCS à  $pO_2$  *in vivo*, nous retenons:

- l'émergence de la mesure des temps de déclin de la fluorescence ou de la phosphorescence, utilisée avec la méthode d'inhibition dynamique et de transfert d'énergie,
- les premiers capteurs monoenzymatiques (oxydase) sont publiés,
- la recherche encore actuelle du meilleur couple fluorophore/membrane.

### Aspect technique

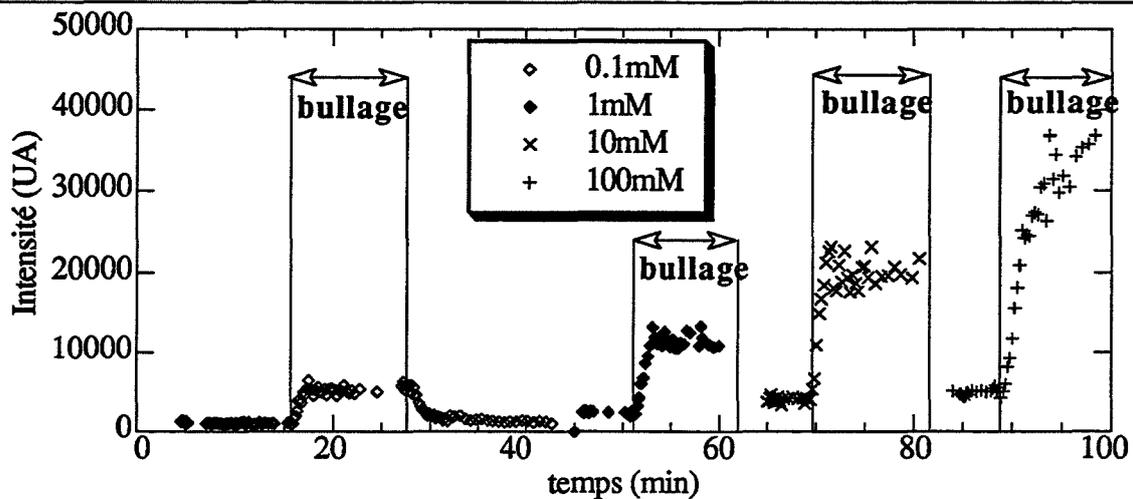
#### Choix de l'agent fluorescent: le naphthalène

Au travers de l'analyse bibliographique exposée ci-dessus concernant le fluorophore, notre choix s'est porté sur le naphthalène. Cette molécule simple présente peu de photolyse et possède la plus grande sensibilité vis-à-vis de l'oxygène [Berlman,1971]. Cependant ses domaines d'excitation et d'émission situés dans l'UV, ont entraîné son éviction, à notre avis prématurée, pour la réalisation de FOCS. En outre de nombreuses études photophysiques du naphthalène sont disponibles pour appréhender la fabrication d'une membrane sensible: la formation d'excimère, son comportement photophysique dans et sur des sol-gel [Yamanaka,1991], [Kitamura,1991] ...

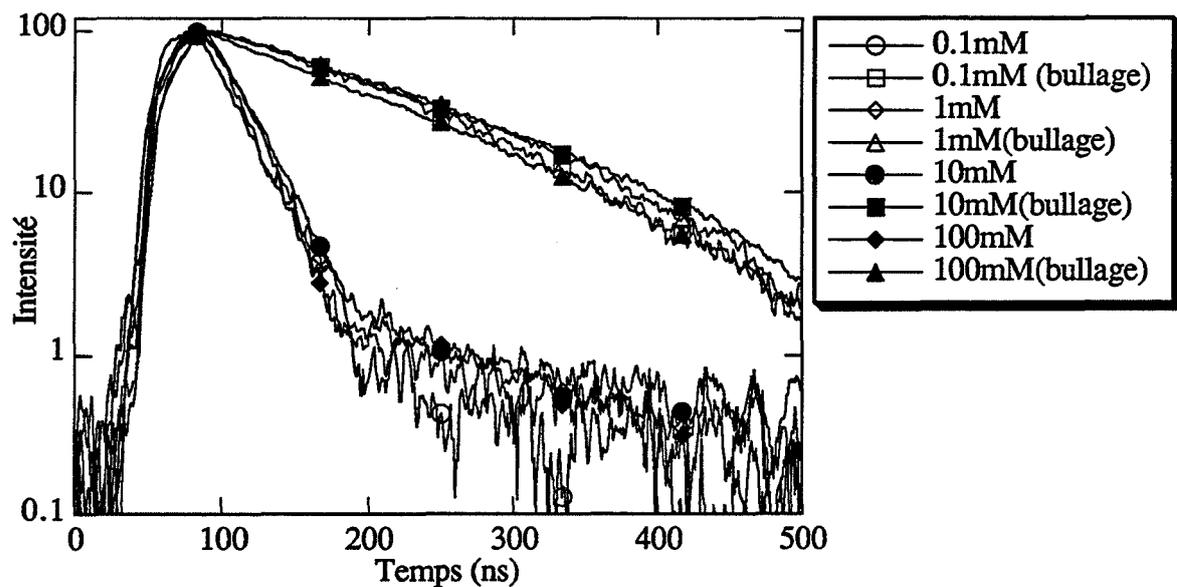
#### Premières tentatives *in vitro*

Nous avons utilisé le naphthalène dissous dans de l'éthanol. Les mesures ont été réalisées avec le même appareillage présenté à la Figure IV-1. L'excitation est à 266nm et l'émission est analysée à 340nm.

L'élimination de l'oxygène dissous s'est effectué par barbotage d'azote à température ambiante [Matsuzawa,1990]. Nous avons reporté sur la Figure IV-4, un cycle de barbotage pour quatre concentrations de naphthalène. Lors du barbotage d'azote, la pression partielle d'oxygène dissous chute, la fluorescence augmente et le temps de fluorescence augmente (Figure IV-5 et Figure IV-6).



**Figure IV-4:**  
Cycle de barbotage d'azote pour quatre concentrations de naphthalène (0.1, 1, 10 et 100 mM) dans l'éthanol.

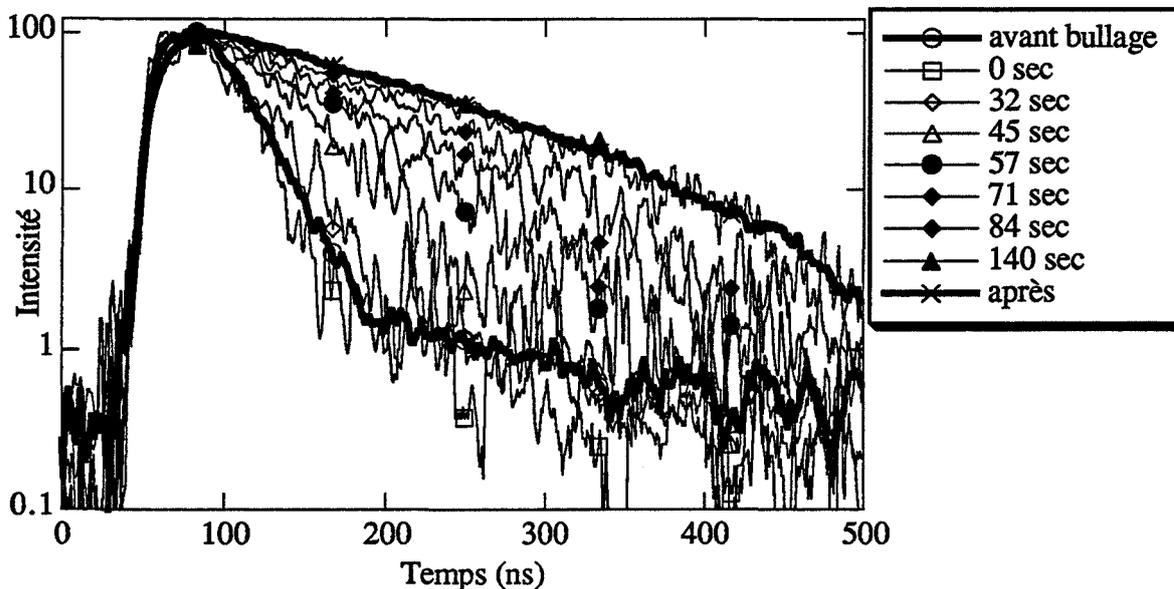


**Figure IV-5:**  
Variation du temps de fluorescence lors du barbotage d'azote pour des solutions de naphthalène à 0.1, 1, 10 et 100mM dans l'éthanol.

Sur la Figure IV-5, nous pouvons déjà remarquer:

- les faibles variations de la forme temporelle de la fluorescence suivant les concentrations de naphthalène utilisées; ce qui est en conformité avec les résultats de la littérature: à partir de 500mM l'émission d'excimère centrée sur 375nm apparaît franchement [Yamanaka,1991];
- l'écart important entre la FRT du naphthalène avant et après barbotage.

La Figure IV-6 expose une cinétique expérimentale de la FRT du naphthalène lors d'un barbotage d'azote. Chaque courbe en trait fin correspond à une moyenne de la FRT sur 3.3s.

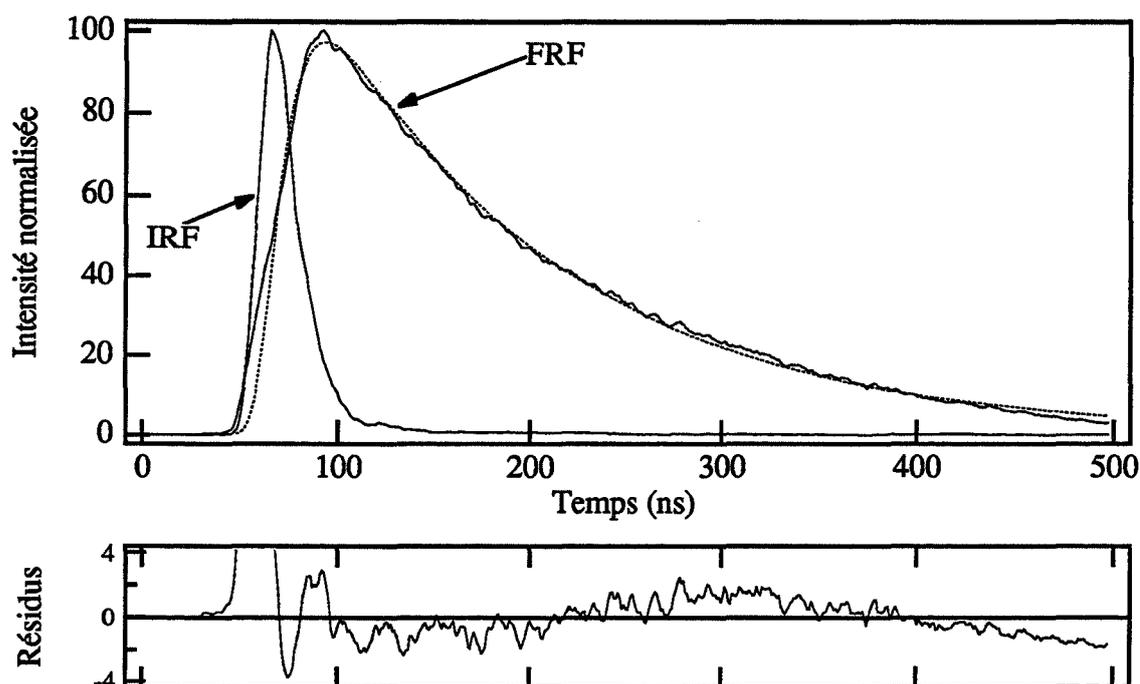


**Figure IV-6:**

**Cinétique de la FRT d'une solution de naphthalène à 1mM dans l'éthanol  
lors d'un barbotage d'azote**

(temps t zéro: début du barbotage; les courbes en trait plein et en trait fin sont respectivement une moyenne sur 1024 coups laser et sur 64 coups laser.

Nous avons vu à la section précédente que le lien entre l'intensité de fluorescence et le temps de déclin avec la teneur en oxygène du milieu s'exprime par l'équation de Stern-Volmer ( $\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_d [O_2]$ ). Pour l'utiliser il faut déterminer  $I_0$  et  $\tau_0$ . S'il est direct de déterminer  $I_0$ ,  $\tau_0$  nécessite un calcul d'identification paramétrique comme nous l'avons déjà souligné lors de la détermination de temps de déclin dans les chapitres précédents. La Figure IV-7 donne le résultat et la qualité de cette identification:  $\tau_0$  est égal à  $120\text{ns} \pm 4\text{ns}$ . Cette valeur est en accord avec les données de la littérature, concernant le naphthalène dans l'éthanol à température ambiante, obtenues par dégazage à l'azote [Matsuzawa,1990].



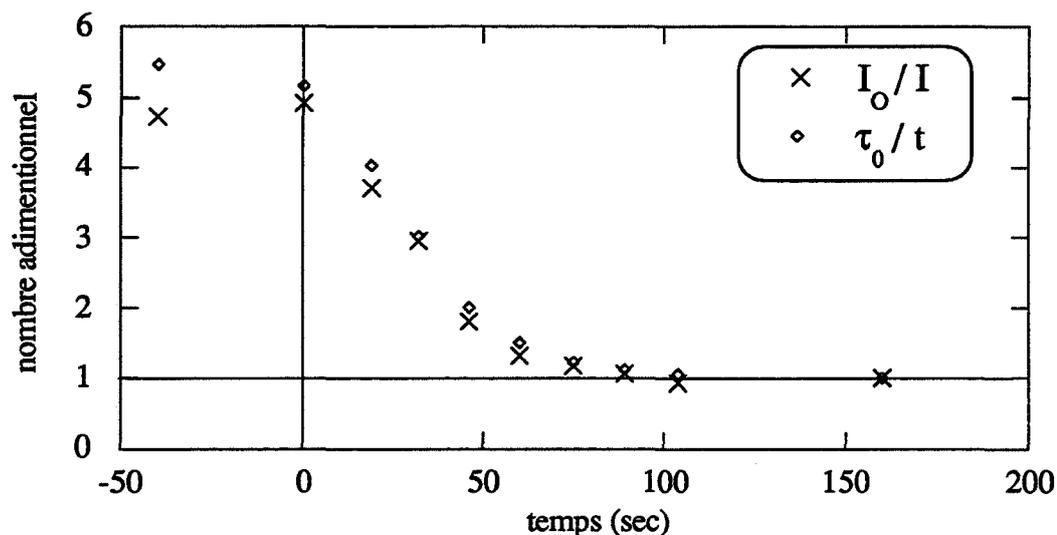
**Figure IV-7:**

Analyse de la FRT du naphthalène dans l'éthanol dégazé.  
La convolution IRF-{monoexponentielle de 120ns} est en pointillée.

A partir des valeurs de  $I_0$  et  $\tau_0$ , nous avons reporté sur la Figure IV-8 le nombre adimensionnel  $\frac{I_0}{I}$  et  $\frac{\tau_0}{\tau}$  en fonction du temps lors d'un barbotage à l'azote. Il faut remarquer le bon accord entre les deux courbes.

Les rapports  $\frac{I_0}{I_{\text{equ}}}$  et  $\frac{\tau_0}{\tau_{\text{equ}}}$  sont respectivement de 4.8 et de 5.5 (avec  $I_{\text{equ}}$  et  $\tau_{\text{equ}}$  les données obtenues pour la solution de naphthalène dissous dans l'éthanol en équilibre avec l'air à température ambiante). Ces résultats sont en excellent accord avec ceux de la littérature puisque le rapport  $\frac{I_0}{I_{\text{equ}}}$  est donné à 5.5 pour le naphthalène dans l'éthanol [Matsuzawa,1990].

La valeur du nombre adimensionnel  $\frac{I_0}{I}$  ou  $\frac{\tau_0}{\tau}$  soustrait de un étant égale à  $K_d[\text{O}_2]$ , la Figure IV-8 montre la cinétique de la teneur en oxygène lors du dégazage par barbotage d'azote.

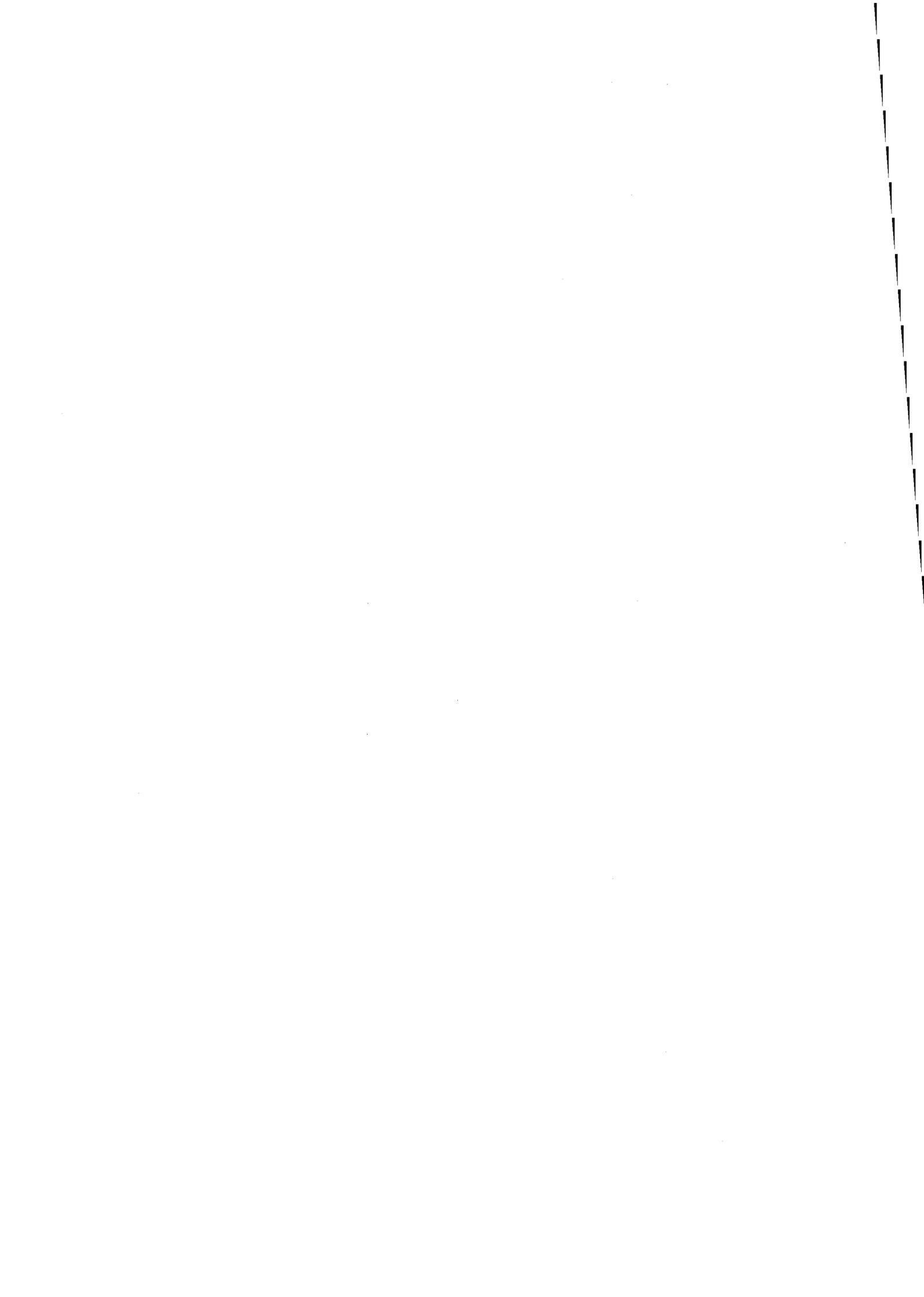


**Figure IV-8:**

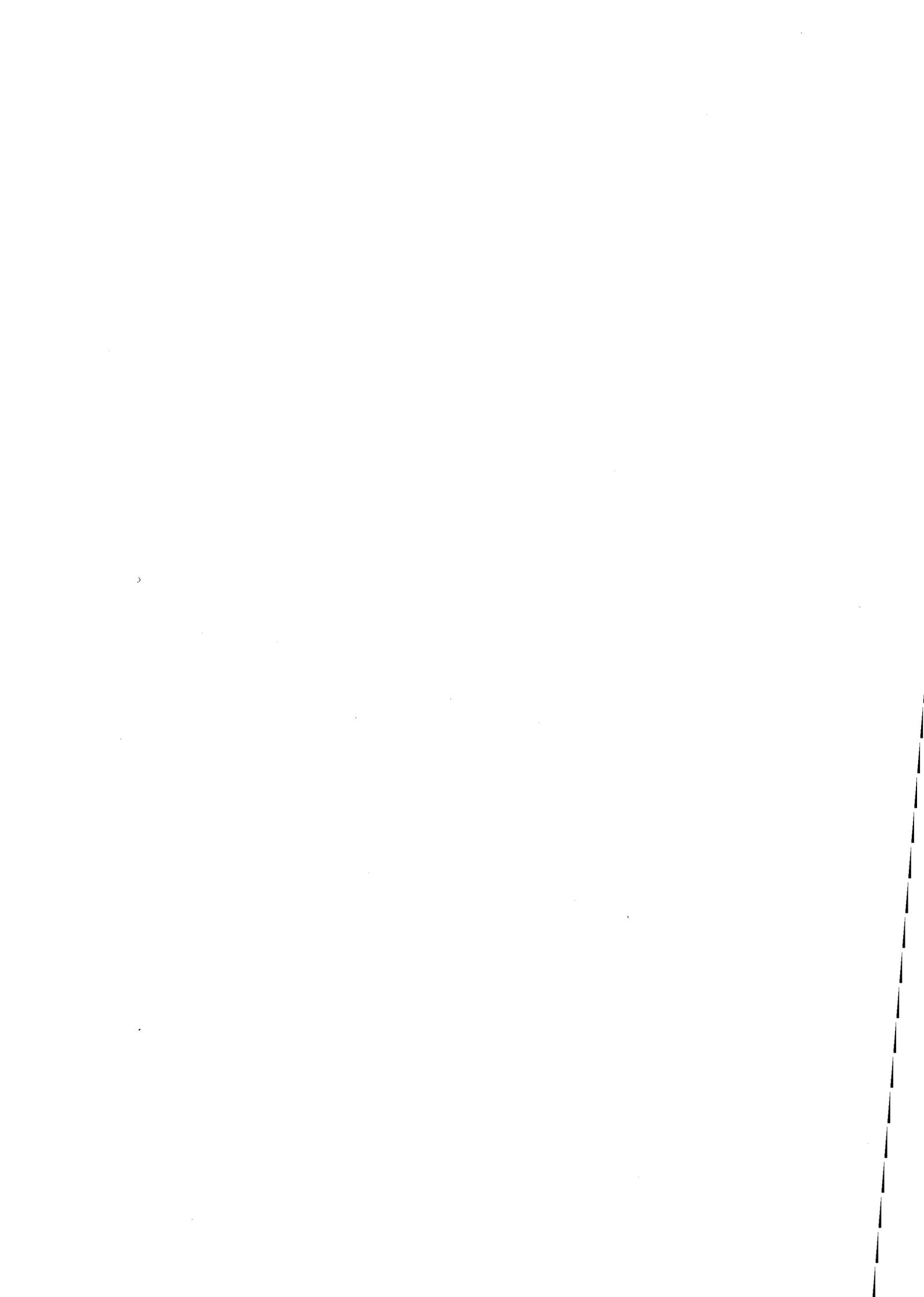
Variation des nombres adimensionnels  $\frac{I_0}{I}$  et  $\frac{\tau_0}{\tau}$   
 lors du barbotage d'azote pour la solutions de naphthalène  
 à 10mM dans l'éthanol (le temps zéro correspond au début du barbotage).

### Conclusions

Nous venons de montrer la faisabilité expérimentale pour la mesure de l'oxygène *in vitro* en solution ainsi que la possibilité de mesurer la fluorescence du tissu cérébral chez l'animal libre dans les mêmes conditions instrumentales. La fabrication reproductible et commode d'une couche sensible sur le microcapteur développé utilisant les mêmes approches techniques est la perspective immédiate de ce travail. Il reste à définir les points de recherche orientés vers le génie des matériaux déposés en bout de fibre. Nous avons déjà souligné un des choix possible du matériau que constitue les sol-gels. Nous pensons que ce support est le meilleur candidat.



## BIBLIOGRAPHIE



## BIBLIOGRAPHIE

- 1..... **Adell, A.; Carceller, A.; Artigas, F.;** Regional distribution of extracellular 5-HT and 5-HIAA in the brain of freely moving rats; *J.Neurochem.*; **1991**, 56, 2, 709-712.
- 2..... **Albinsson, B.; Kubista, M.; Nordén, B.; Thulstrup, E. W.;** Near-UV electronic transitions of the tryptophan chromophore: linear dichroism, fluorescence anisotropy, and magnetic circular dichroism spectra of some indole derivative.; *J.Phys.Chem.*; **1989**, 93, 6646-6654.
- 3..... **Albinsson, B.; Nordén, B.;** Excited-state properties of the Indole Chromophore. Electronic Transition Moment direction from linear dichroism measurement: effect of methyl and methoxy substituents; *J.Phys.Chem.*; **1992**, 96, 6204-6212.
- 4..... **Alcock, S. J.; Danielsson, B.; Turner, A. P. F.;** Advances in the use of in vivo sensors; *Biosensors & bioelectronics*; **1992**, 7, 243-254.
- 5..... **Alfano, R. R.; Pradhan, A.; Tang, G. C.; Wahl, S. J.;** Optical spectroscopy diagnosis of cancer and normal breast tissues; *J.Opt.Soc.Am.B.*; **1989**, 6, 5, 1015-1023.
- 6..... **Andersson, P. S.; Kjellén, E.; Montán, S.; Svanberg, K.; Svanberg, S.;** Autofluorescence of various rodent tissue and human skin tumour samples; *Laser Med.Sci.*; **1987**, 2, 41-49.
- 7..... **Andersson, S.; Brun, A.; Kjellén, E.; Salford, L. G.; Strömblad, L. G.; Svanberg, K.; Svanberg, S.;** Identification of brain tumours in rats using laser-induced fluorescence and Haematoporphyrin derivative; *Laser Med.Sci.*; **1989**, 4, 241-249.
- 8..... **Andersson, S.; Johansson, J.; Svanberg, S.; Svanberg, K.;** Fluorescence diagnosis and photochemical treatment of diseased tissue using laser: part II; *Anal.Chem.*; **1990**, 62, 1, 19A-27A.
- 9..... **Archenault, M.;** Etude et réalisation d'un réfractomètre automatique et d'un capteur chimique intrinsèque à fibre optique multimodale; St-Étienne, France; **1992**,
10. .... **Arnold, S.; Sulkes, M.;** Spectroscopy of solvent complexes with indoles: Induction of  ${}^1L_a - {}^1L_b$  state coupling; *J.Phys.Chem.*; **1992**, 96, 4768-4778.
11. .... **Ashcroft, G. W.; Sharman, D. F.;** 5-hydroxyindoles in human cerebrospinal fluids; *Nature*; **1960**, 186, 1050-1051.
12. .... **Atkins, P. W.;** Physical chemistry; San Fransisco; Freeman W.H. and Company; **1978**, 584-588.
13. .... **Azimi, N. T.; Wen, F.; Lister, R. M.; Chen, D. A.; Lytle, F. E.;** Enzyme-linked immunoassays using nanosecond fluorometric detection; *Appl.Spectrosc.*; **1992**, 46, 6, 994-998.
14. .... **Bacon, J. R.; Demas, J. N.;** Determination of oxygen concentrations by luminescence quenching of a polymer-immobilized transition-metal complex; *Anal.Chem.*; **1987**, 59, 23, 2780-2785.
15. .... **Bahtat, M.;** Caractérisation structurale et propriétés de couches minces de TiO<sub>2</sub> obtenues par le procédés sol-gel; Lyon I; Univ. Cl. Bernard; **1992**,
16. .... **Barriol, J.;** Eléments de mécanique quantique; Paris; Masson; **1966**, 76-78.

17. .... **Basile, F.; Cardamone, A.; grinstead, K. D.; Miller, K. J.; Lytle, F. E.; Caprara, A.; Clark, C. D.; Héritier, J. M.;** Simple time-resolved fluorometer based on a nanosecond digital oscilloscope and a diode-pumped, solid-state laser; *Appl.Spectrosc.*; **1993**, 47, 2, 207-210.
18. .... **Beck, O.; Lundman, A.; Jonsson, G.;** 5-HTOL and 5-HIAA levels in rat brain: effect of various drugs affecting serotonergic transmitter mechanisms; *J.Neural Transm.*; **1987**, 69, 287-298.
19. .... **Berlman, I. B.;** Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules; New York; Academic Press; **1971**, 18-24.
20. .... **Birks, J. B.;** Photophysics of aromatic molecules; Londre; Wiley-interscience; **1970**,
21. .... **Boisde, G.; Perez, J. J.;** Remote spectrometry with optical fibers, ten years of development and prospect for in-line control; *J.Proc.SPIE-int.Soc.Opt.Eng.*; **1984**, 514, 227-231.
22. .... **Boisde, G.;** Capteurs chimiques à fibre optique; MESUCORA; Paris; CIAME; **1988a**, 1-27.
23. .... **Boisde, G.; Blanc, F.; Perez, J. J.;** Chemical measurements with optical fibers for process control; *Talanta*; **1988b**, 35, 2, 75-82.
24. .... **Boisde, G.; Kirsch, B.; Mauchien, P.; Rougeault, S.;** Nouvelle optode passive pour la spectrofluorimétrie et la spectrométrie Raman; OPTO; Paris; Masson; **1988c**, 294-299.
25. .... **Boisde, G.;** Les capteurs à fibre optique en contrôle de procédés; Technica; **1989**, 462, 28-32.
26. .... **Borman, S. A.;** Optrodes; *Anal. Chem.*; **1981**, 53, 14, 1616A-1618A.
27. .... **Boulnois, J. L.;** Sur les processus photophysiques dans les applications médicales des lasers (partie n°1 et 2); *RBM*; **1988**, 9, 1 et 2, 26-76 et 69-76.
28. .... **Brendle, P.; Cohendet, P.; Gaffard, J. L.; Larue de Tournemine, R.;** Les enjeux industriels de la photonique; Paris; La documentation française; **1983**, I et II,
29. .... **Bridges, J. W.; Williams R.T.;** the fluorescence of indoles and aniline derivatives; *Biochem. J.*; **1968**, 107, 225-237.
30. .... **Bright, F. V.; Vickers, G. H.; Hieftje, G. M.;** Use of time resolution to eliminate bilirubin interference in the determination of fluorescein; *Anal.Chem.*; **1986**, 58, 1225-1227.
31. .... **Brochon, J. C.; Wahl, P.; Jallon, J. M.; Iwatsubo, M.;** Pulse fluorimetry study of beef liver glutamate dehydrogenase-reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate complexes; *Biochemistry*; **1976**, 15, 15, 3259-3265.
32. .... **Brown, R. G. W.;** Laser fibre optics in biotechnology; *Trends in Biotechnology*; **1985**, 3, 8, 200-203.
33. .... **Bryan, R. M.; Jobsis, F. F.;** The cerebral redox stae in cats during severe insulin induced hypoglycemia; *Brain Research*; **1983**, 279, 266-270.
34. .... **Bryan, R. M.; Jobsis, F. F.;** Insufficient supply of reducing equivalents to the respiratory chain in cerebral cortex during severe insulin-induced hypoglycemia in cats; *J.Cereb.Blood Flow Metab.*; **1986**, 6, 3, 286-291.
35. .... **Buckingham, R. L.; Radulovacki, M.;** 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid: an indicator of slow-wave sleep; *Brain Research*; **1975**, 99, 440-443.

36. .... **Bugg, C.; Thewalt, U.**; Crystal Structure of serotonin picrate, a donor-acceptor complex; *Science*; **1970**, 170, 852-854.
37. .... **Bulmar, C.**; How an oscilloscope analyzes optical signals; *Laser Focus World*; **1992**, 28, 12, 113-119.
38. .... **Cagnac, B.; Pebay-Peyroula, J. C.**; physique atomique tome 2; Paris; Dunod université; **1971**, 502-511.
39. .... **Caillet, J.; Claverie, P.; Pullman, B.**; On the conformations varieties of 5-methoxy-N,N-diméthyltryptamine and serotonin in crystalline environment; *Acta Cryst.*; **1977**, A33, 885-889.
40. .... **Callis, P. R.**; Transition density topology of the  $L_a$  and  $L_b$  states in Indoles and Purines; *Int.J.Quantum Chem., Quantum Chem. Symp.*; **1984**, 18, 579-588.
41. .... **Callis, J. B.; Illman, D. L.; Kowalski, B. R.**; Process analytical chemistry; *Anal.Chem.*; **1987**, 59, 9, 624A-637A.
42. .... **Callis, P. R.**; Molecular orbital theory of the  $^1L_a$  et  $^1L_b$  states of indole; *J.Chem.Phys.*; **1991**, 95, 6, 4230-4240.
43. .... **Campos, T. L.; Lytle, F. E.**; Fluorometric data processing strategies using nanosecond waveform digitizers; *Appl.Spectrosc.*; **1992**, 46, 12, 1859-1865.
44. .... **Carlsson, A.; Lindqvist, M.**; Accumulation of 5-hydroxytryptophan in mouse brain after decarboxylase inhibition; *J.Pharm.Pharmac.*; **1970**, 22, 726-727.
45. .... **Carlsson, A.; Lindqvist, M.**; The effect of L-Tryptophane and some psychotropic drugs on the formation of 5-HTP in mouse brain in vivo; *J.Neural Transm.*; **1972**, 33, 23-43.
46. .... **Carroll, M. K.; Bright, F. V.; Hieftje, G. M.**; Fiber-optic time-resolved fluorescence sensor for the simultaneous determination of  $Al^{3+}$  and  $Ga^{3+}$  or  $In^{3+}$ ; *Anal.Chem.*; **1989**, 61, 1768-1772.
47. .... **Carroll, M. K.; Hieftje, G. M.**; Effect of optical-fiber length on the width of a transmitted laser pulse: comparison of theoretical calculations and experimentally measured pulses; *Appl.Spectrosc.*; **1991**, 45, 6, 1053-1056.
48. .... **Carraway, E. R.; Demas, J. N.; DeGraff, B. A.**; Luminescence quenching mechanism for microheterogeneous systems; *Anal.Chem.*; **1991**, 63, 4, 332-336.
49. .... **Carraway, E. R.; Demas, J. N.; Degraff, B. A.; Bacon, J. R.**; Photophysics and photochemistry of oxygen sensors based on luminescent transition-metal complexes; *Anal.Chem.*; **1991b**, 63, 4, 337-342.
50. .... **Castelli, F.**; Determination of correct reference fluorescence lifetimes by self-consistent internal calibration.; *Rev.Sci.Instrum.*; **1985**, 56, 4, 538-542.
51. .... **Catalan, J.; Perez, P.; Acuña, A. U.**; Indole spectroscopy: the location of the  $1L_a$  and  $1L_b$  electronic states and the absorption spectrum; *J. Mol. Struct.*; **1986**, 142, 179-182.
52. .... **Cerovic, Z. G.; Bergher, M.; Goulas, Y.; Tosti, S.; Moya, I.**; Simultaneous measurement of changes in red and in blue fluorescence in illuminated isolated chloroplasts and leaf pieces: the contribution of NADPH to the blue fluorescence signal; *Photosynth. Res.*; **1993**, à paraître.
53. .... **Cespuglio, R.; Gomez, M. E.; Walker, E.; Juvet, M.**; Effets du refroidissement et de la stimulation des noyaux du système du raphé sur les

- états de vigilance chez le chat; EEG Clin. Neurophysiol.; **1979**, 47, 289-308.
54. .... **Cespuglio, R.; Faradji, H.; Hahn, Z.; Jouvét, M.**; Voltammetric detection of brain 5-hydroxyindolamines by means of electrochemically treated carbon fibre electrodes: chronic recordings for up to one month with movable cerebral electrodes in sleeping or waking rat; Measurement of neurotransmitter release; Marsden, C. A.; Chichester; Wiley and Sons; **1983**, 173-191.
55. .... **Cespuglio, R.; Sarda, N.; Gharib, A.; Faradji, H.; Chastrette, N.**; Differential pulse voltammetry in vivo with working carbon fiber electrodes: 5-hydroxyindole compounds or uric acid detection; Exp.Brain.Res.; **1986**, 64, 595-598.
56. .... **Cespuglio, R.; Chastrette, N.; Jouvét, M.**; Variations opposées des concentrations extracellulaires de l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) mesurées par la voltamétrie au niveau des terminaisons axonales et des corps cellulaires du noyau du raphé dorsalis, à travers le cycle veille-sommeil; C.R.Acad.Sc. Paris; **1988**, 307, 817-823.
57. .... **Cespuglio, R.; Houdoin, F.; Oulerich, M.; El Mansari, M.; Jouvét, M.**; Axonal and somato-dendritic modalities of serotonin release: their involvement in sleep preparation, triggering and maintenance; J.Sleep Res.; **1992**, 1, 150-156.
58. .... **Chance, B.; Williams, G. R.**; The respiratory chain and oxydative phosphorylation; Adv. Enzymol.; **1956**, 17, 65-134.
59. .... **Chance, B.; Cohen, P.; Jobsis, F.; Schoener, B.**; Intracellular oxidation-reduction states in vivo; Science; **1962**, 137, 3529, 499-508.
60. .... **Chance, B.; Schoener, B.; Krejci, K.; Rüssmann, W.; Wesemann, W.; Schnitger, H.; Bücher, T.**; Kinetics of fluorescence and metabolite changes in rat liver during a cycle of ischemia; Biochem.Z.; **1965a**, 341, 325-333.
61. .... **Chance, B.; Williamson, J. R.; Jamieson, D.; Schoener, B.**; Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide fluorescence of the isolated and in vivo rat heart; Biochem.Z.; **1965b**, 341, 357-377.
62. .... **Chang, K.; Forcé, R. K.**; Time-resolved laser-induced fluorescence study on dyes used in DNA sequencing; Appl.Spectrosc.; **1993**, 47, 1, 24-29.
63. .... **Chappey, O.; Testylier, G.; Gourmelon, P.; Galonnier, M.; Bourre, J. M.; Fatome, M.; Scherrmann, J. M.; Viret, J.**; *In vivo* spectrophotometric determination of striatal acetylcholinesterase activity: the modulation induced by the antidepressant amitriptyline; J.Neurochem; **1990**, 54, 1, 333-337.
64. .... **Chen, R. F.**; Fluorescence decay times; Science; **1967**, 156, 949-951.
65. .... **Chen, R. F.**; Fluorescence of Protonated excited-state forms of 5-HT and related indoles; Proc.Nat.Acad.Sci.USA; **1968**, 60, 598-605.
66. .... **Chothia, C.; Pauling, P.**; On the conformations of hallucinogenic molecules and their correlation; Proc.Nat.Acad.Sci.; **1969**, 63, 1063-1070.
67. .... **Cilento, G.; Tedeschi, P.**; Pyridine Coenzymes; J.Biol.Chem.; **1961**, 236, 3, 907-910.
68. .... **Coburn, J. T.; Lytle, F. E.; Huber, D. M.**; Identification of bacterial pathogens by laser excited fluorescence; Anal.Chem.; **1985**, 57, 8, 1669-1673.

69. .... **Cohen, E. R.; Taylor, B. N.;** The fundamental physical constants; *Physics Today*; **1992**, 45, 8, BG9-BG13.
70. .... **Collison, M. E.; Meyerhoff, M. E.;** Chemical sensors for bedside monitoring of critically ill patients; *Anal.Chem.*; **1990**, 62, 7, 425A-437A.
71. .... **Cox, M. E.; Dunn, B.;** Detection of oxygen by fluorescence quenching; *Applied Optics*; **1985**, 24, 14, 2114-2120.
72. .... **D'Arrigo, G.; Maisano, G.; Mallamace, F.; Migliardo, P.; Wanderligh, F.;** Raman scattering and structure of normal and supercooled water; *J.Chem.Phys.*; **1981**, 75, 9, 4264-4270.
73. .... **Davis G.;** Advances in biomedical sensor technology: a review of the 1985 patent literature; *Biosensors*; **1986**, 2, 101-124.
74. .... **DeHart, T. G.;** Where and why optical fibers fail...and how to prevent it; *Photonics Spectra*; **1992**, Nov., 107-110.
75. .... **DelBene, J.; Jaffe, H. H.;** Use of the CNDO method in spectroscopy; *J. Chem Phys .*; **1968**, 48, 4,9, 1807-1813,4050-4055.
76. .... **Desilets, D. J.; Coburn, J. T.; Lantrip, D. A.; Kissinger, P. T.; Lytle, F. E.;** On-the-fly determination of fluorescence lifetimes from two-point decay measurements; *Anal.Chem.*; **1986**, 58, 1123-1128.
77. .... **DexpertGhys, J.; Halwani, J.; Piriou, B.;** On the use of optical fibers and laser beam excitation for the remote analysis of lanthanide ions in solution; *Analisis*; **1988**, 16, Suppl. n°9-10, 81-86.
78. .... **Dinkel, D. M.; Lytle, F. E.;** Fiber-optic probe for collection of two-photon excited fluorescence spectra in low-temperature glassy solvents; *Appl.Spectrosc.*; **1992**, 46, 11, 1732-1736.
79. .... **Dubosc, D.; Renault, G.; Polianski, J.; Muffat-Joly, M.; Toussaint, M.; Guérin, F.; Pocardalo, J. J.; fardeau, M.;** NADH measured by laser fluorimetry in skeletal muscle in McArdle's disease; *N.Engl.J.Med.*; **1987**, 316, 26, 1664-1665.
80. .... **Duggan, D. E.; Bowman, R. L.; Brodie, B. B.; Udenfriend, S.;** a spectrophotofluorometric study of compounds of biological interest; *Arch. Biochem.Biophys.*; **1957**, 68, 1-14.
81. .... **Eftink, M. R.; Selvidge, L. A.; Callis, P. R.; Rehms, A. A.;** Photophysics of Indole Derivatives: experimental resolution of  $L_a$  and  $L_b$  transitions and comparison with theory; *J.Phys.Chem.*; **1990**, 94, 3469-3479.
82. .... **Estabrook, R. W.;** Fluorometric measurement of reduced pyridine nucleotide in cellular and subcellular particles; *Anal. Biochem.*; **1962**, 4, 231-245.
83. .... **Everett, M. A.; Yeagers, E.; sayre, R. M.; Olson, R. L.;** Penetration of epidermis by UV rays; *Photochem.Photobiol.*; **1966**, 5, 533-542.
84. .... **Feitelson, J.;** On the interpretation of molecular spectra in odd-membered aromatic compounds; *J.Chem.Phys.*; **1965**, 43, 7, 2511-2518.
85. .... **Fleming, G. R.; Wolynes, P. G.;** Chemical dynamics in solution; *Physics today*; **1990**, 43, 5, 36-43.
86. .... **Fornal, C. A.; Jacobs, B. L.;** Physiological and behavioral correlates of serotonergic single-unit activity; *Neuronal Serotonin*; Osborne, N. N.; Hamon, M.; Chichester, U.K.; Wiley J. and Sons; **1988**, 305-345.

- 
87. .... **Gafni, A.; Brand, L.**; Fluorescence decay studies of reduced nicotinamide adenine dinucleotide in solution and bound to liver alcohol dehydrogenase; *Biochemistry*; **1976**, 15, 15, 3165-3171.
  88. .... **Gallant, D. J.; Irving, D. W.**; Analyse d'image en fluorescence; *Analysis*; **1991**, 19, 7, M25-M31.
  89. .... **GarciaAustt, E.; Velluti, R.; Villar, J. I.**; Changes of brain pO<sub>2</sub> during paradoxical sleep in cats; *Physiol. Behav.*; **1968**, 3, 477-485.
  90. .... **Gehrich, J. L.; Lübbers, D. W.; Opitz, N.; Hansmann, D. R.; Miller, W. W.; Tusa, J. K.; Yafuso, M.**; Optical fluorescence and its application to an intravascular blood gas monitoring system; *IEEE transactions on biomedical engineering*; **1986**, BME-33, 2, 117-132.
  91. .... **Gewehr, P. M.; Delpy, D. T.**; Optical oxygen sensor based on phosphorescence lifetime quenching and employing a polymer immobilised metalloporphyrin probe; *Med.&Biol.Eng.&Comput.*; **1993**, 31, 2-21.
  92. .... **Gille, J. C.**; Signaux déterministes; *Techniques de l'ingénieur*; Paris; **1988**, R7010 1-17.
  93. .... **Glasser, N.**; Transitions radiatives et non radiatives dans l'indole et ses dérivées; Strasbourg; Université Louis Pasteur; **1979**,
  94. .... **Glushkov, S. M.; Panchishin, I. M.; Fadeev, V. V.**; Observation of the "anomalous" spectra of Raman scattering of light during the water-ice phase transition; *Sov.Phys.Dokl.*; **1986**, 31, 12, 982-984.
  95. .... **Gorry, P. A.**; Basic molecular spectroscopy; Londres; Butterworths; **1985**, 14-36.
  96. .... **Gottesmann, C.; Mendoza, J. L.; Lacoste, G.; Lallement, B.; Rodriguez, L.; Tasset, M.**; Etude sur l'analyse et la quantification des différents états de veille et de sommeil chez le rat; *C.R.Acad.Sc. Paris*; **1971**, 272, 301-302.
  97. .... **Goure, J. P.**; Capteurs optiques- capteurs à fibres optiques; *Entropie*; **1990**, 155, 18-27.
  98. .... **Grabarits, F.; Harvey, J. A.**; The effects of reserpine on behavior and on brain concentrations of serotonin and norepinephrine in control rats and rats with hypothalamic lesions; *J. Pharmac. exp. Ther.*; **1966**, 153, 3, 401-411.
  99. .... **Green, N. J. B.; Pimblott, S. M.; Tachiya, M.**; Generalizations of the Stern-Volmer Relation; *J.Phys.Chem.*; **1993**, 97, 196-202.
  - 100.... **Grinvald, A.; Steinberg, I. Z.**; On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares; *Anal. Biochem.*; **1974**, 59, 583-598.
  - 101.... **Grinvald, A.**; The use of standards in the analysis of fluorescence decay data; *Anal. Biochem.*; **1976**, 75, 260-280.
  - 102.... **GudginTempleton, E. F.; Ware, W. R.**; The photophysics of 5-methoxytryptophan: influence of the alanyl chain on the fluorescence properties; *Chemical Physics Letters*; **1983**, 101, 345-349.
  - 103.... **Guilbault, G. G.**; Handbook of enzymatic methods of analysis; N.Y.; Marcel Dekker Inc.; **1976**,
  - 104.... **Hamamatsu Photonics**; Picosecond fluorescence lifetime measurement system; Japan; nov. **1991**, SSCS1018E02.
  - 105.... **Hamamatsu Photonics**; Ultrafast MCP-PMT R3809U; Japon; Mars **1992**,

- 106.... **Hanson, A.; Eichler, O.; Farah, A.;** Chemical analysis of indolalkylamines and related compounds; Handbook of experimental pharmacology; Berlin; Springer-Verlag; **1966**, 19, 66-112.
- 107.... **Harbig, K.; ; Chance, B.; Kovach, A. G. B.; Reivich, M.;** In vivo measurement of pyridine nucleotide fluorescence from cat brain cortex; J.Appl.Physiol.; **1976**, 41, 4, 480-488.
- 108.... **Hart, L. P.; Daniels, M.;** Lifetime analysis of weak emissions and time-resolved spectral measurements with a subnanosecond dye laser and gated analog detection; Appl.Spectrosc.; **1992**, 46, 2, 191-205.
- 109.... **Hershberger, M. V.; Lumry, R.; Verrall, R.;** The 3-methylindole/n-butanol exciplexes: evidence for two exciplex sites in indole compounds; Photochem.Photobiol.; **1981**, 33, 609-617.
- 110.... **Hieftje, G. M.; Haugen, G. R.;** Correction of quenching errors in analytical fluorimetry through use of time resolution; Anal.Chim.Acta; **1981**, 123, 255-261.
- 111.... **Hirano, T.; Ishizuka, M.; Suzuki, K.; Ishida, K.; Suzuki, S.; Miyaki, S.; Honma, A.; Suzuki, M.; Aizawa, K.; Kato, H.; Hayata, Y.;** Photodynamic cancer diagnosis and treatment system consisting of pulse laser and an endoscopic spectro-image analyser; Laser in the Life Science; **1989**, 3, 1, 1-18.
- 112.... **HoonHahn, J.; Soper, S.; Nutter, H. L.; Martin, J. C.; Jett, J. H.; Keller, R. A.;** Laser-induced fluorescence detection of rhodamine-6G at  $6 \cdot 10^{-15}$  M; Appl.Spectrosc.; **1991**, 45, 5, 743-746.
- 113.... **Hoshi, Y.; Tamura, M.;** Dynamic changes in cerebral oxygenation in chemically induced seizures in rats: study by near-infrared spectrophotometry; Brain Research; **1993**, 603, 215-221.
- 114.... **Houdouin, F.;** Les modalités de libération de la sérotonine à travers le cycle veille-sommeil du rat. Rôles dans la préparation, le déclenchement et le maintien du sommeil.; Lyon; Université Claude Bernard-Lyon1; **1991**,
- 115.... **Houdoin, F.; Cespuglio, R.; Gharib, A.; Sarda, N.; Jouvét, M.;** Detection of the release of 5-hydroxyindole compounds in the hypothalamus and the n. raphe dorsalis throughout the sleep-waking cycle and during stressful situations in the rat. A polygraphic and voltammetric approach; Exp. Brain Res.; **1991b**, 85, 153-162.
- 116.... **Hugues, K. D.; Lytle, F. E.; Huber, D. M.;** Identification of immobilized bacteria by aminopeptidase profiling; Anal.Chem.; **1989**, 61, 1656-1660.
- 117.... **Inman, S. M.; Thibado, P.; Theriault, G. A.; Lieberman, S. H.;** Development of a pulsed laser, fiber-optic-based fluorimeter: determination of fluorescence decay times of PAH in sea water; Anal.Chim.Acta; **1990**, 239, 45-51.
- 118.... **Jacques, S. L.;** Time-resolved propagation of ultrashort laser pulses within turbid tissues; Applied Optics; **1989**, 28, 12, 2223-2229.
- 119.... **Janata, J.;** Chemical sensors; Anal.Chem.; **1992**, 64, 12, 196R-219R.
- 120.... **Ji, S.; Chance, B.; Stuart, B. H.; Nathan, R.;** Two-dimensionnal analysis of the redox state of the rat cerebral cortex in vivo by NADH fluorescence photography; Brain Research; **1977**, 119, 357-373.

- 
- 121.... Jouvét, M.; Michel, F.; Courjon, J.; Sur le stade d'activité électrique cérébrale au cours du sommeil physiologique; C.R.Soc.Biol.; **1959**, 153, 1024-1028.
- 122.... Jouvét, M.; Biogenic amines and the states of sleep; Science; **1969**, 163, 32-41.
- 123.... Jouvét, M.; Le sommeil et le rêve; Paris; Odile Jacob; **1992**,
- 124.... Jovanic, S. V.; Steenken, S.; Simic, M. G.; One-electron reduction potentials of 5-indoxyl radicals; J.Phys.Chem.; **1990**, 94, 3583-3588.
- 125.... Junker, B. H.; Wang, D. I. C.; Hatton, T. A.; Fluorescence sensing of fermentation parameters using fiber optics; Biotechnol.Bioeng.; **1988**, 32, 55-63.
- 126.... Kalén, P.; Strecker, R. E.; Rosengren, E.; Bjorklund, A.; Endogenous release of neuronal serotonin and 5-HIAA in the caudate-putamen of the rat as revealed by intracerebral dialysis coupled to HPLC with fluorimetric detection; J.Neurochem.; **1988**, 51, 1422-1435.
- 127.... Kang, S.; Conformational analysis of 5-hydroxytryptamine and its cation: Y, F-Energy contour diagram by the INDO molecular orbital method; Theoret. Chim. Acta (Berl); **1971**, 22, 176-183.
- 128.... Kar, S.; Arnold, M. A.; Fiber-optic ammonia sensor for measuring synaptic glutamate and extracellular ammonia; Anal.Chem.; **1992**, 64, 20, 2438-2443.
- 129.... Karle, I. L.; Dragonette, K. S.; Brenner, S. A.; The crystal and molecular structure of the serotonin-creatinine sulphate complex; Acta Cryst.; **1965**, 19, 713-716.
- 130.... Kauzman, W.; Quantum chemistry, an introduction; New York; Academic Press; **1957**, 524-528, 637-654.
- 131.... Kawabata, Y.; Imasaka, T.; Ishibashi, N.; Laser fluorimetry of PAH based on time-resolved fluorescence detection; Anal.Chim.Acta; **1985**, 173, 367-372.
- 132.... Kearns, D. R.; Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen; Chem.Rev.; **1971**, 71, 395-427.
- 133.... Kier, L. B.; Preferred Conformation of Serotonin and a postulate on the nature of its Receptor from Molecular Orbital Calculations; Journal of Pharmaceutical Sciences; **1968**, 57, 7, 1188-1191.
- 134.... Kitamura, T.; Takahashi, Y.; Yamanaka, T.; Uchida, K.; Luminescence associated with the molecular aggregation of hydrocarbons doped in amorphous silica glasses; J.Luminesc; **1991**, 48&49, 373-376.
- 135.... Klopman, G.; Evans, R. C.; Segal G.A.; Semiempirical methods of electronic structure calculation PartA: Techniques; N.Y; Plenum Press; **1977**, 29-68.
- 136.... Knott, P. J.; Osborne, N. N.; Hamon, M.; Modern methods for studying the release of serotonin; Neuronal serotonin; N.Y.; Wiley-Interscience; **1988**, 93-127.
- 137.... Kobayashi, S.; Nishiki, K.; Kaede, K.; Ogata, E.; Optical consequences of blood substitution on tissue oxidation-reduction state microfluorometry; J.Appl.Physiol.; **1971a**, 31, 1, 93-96.

- 138.... Kobayashi, S.; Kaede, K.; Nishiki, K.; Ogata, E.; Microfluorometry of oxidation-reduction rate of the rat kidney in situ; *J.Appl.Physiol.*; **1971b**, 31, 5, 693-696.
- 139.... Koe, B. K.; Weissman, A.; p-chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin; *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; **1966**, 154, 499-516.
- 140.... Kramer, R. S.; Pearlstein, R. D.; Cerebral cortical microfluorometry at isobesticwavelengths for correction of vascular artifact; *Science*; **1979**, 205, 17, 693-696.
- 141.... Kroneis, H. W.; Marsoner, H. J.; A fluorescence-based sterilizable oxygen probe for use in bioreactors; *Sensors and Actuators*; **1983**, 4, 587-592.
- 142.... Krull, U. J.; Brown, R. S.; Fiber-optic remote chemical sensing; *Laser remote chemical analysis*; Measures, R. M.; N. Y.; Wiley-interscience; **1988**, 94, 505-532.
- 143.... Kuhn, W.; Braun, E.; Messung und deutung der rotationsdispersion einfacher stoffe; *Z.f.Phys.Chem.(B)*; **1930**, 8, 281-313.
- 144.... Kume, H.; Koyama, K.; Nakatsugawa, K.; Suzuki, S.; Fatlowitz, D.; Ultrafast microchannel plate photomultipliers; *Applied Optics*; **1988**, 27, 5, 1170-1178.
- 145.... Kume, H.; Taguchi, T.; Nakatsugawa, K.; Osawa, K.; Suzuki, S.; Reiji, S.; Nishimura, Y.; Yamazaki, I.; Compact ultrafast microchannel plate PMT; *SPIE International Symposium in Laser Spectroscopy*; **1992**,
- 146.... Lakowicz, J. R.; Fluorescence lifetime sensing generates cellular images; *Laser Focus World*; **1992a**, 28, 5, 60-80.
- 147.... Lakowicz, J. R.; Szmecinski, H.; Nowaczyk, K.; Johnson, M. L.; Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH; *Proc. Nat. Acad.Sci.USA*; **1992b**, 89, 1271-1275.
- 148.... Lakowicz, J. R.; Maliwal, B.; Optical sensing of glucose using phase-modulation fluorimetry; *Anal.Chim.Acta*; **1993a**, 271, 155-164.
- 149.... Lakowicz, J. R.; Szmecinski, H.; Karakelle, M.; Optical sensing pf pH and pCO<sub>2</sub>using phase-modulation fluorimetry and resonance energy transfer; *Anal.Chim.Acta*; **1993b**, 272, 179-186.
- 150.... Lami, H.; On the possible role of a mixed valence-Rydberg state in the fluorescence of indoles; *J.Chem.Phys.*; **1976**, 67, 7, 3274-3281.
- 151.... Lami, H.; Glasser, N.; Indole's solvatochromism revisited; *J. Chem. Phys.*; **1986**, 84, 2, 597-604.
- 152.... Lampert, R. A.; Chewter, L. A.; Phillips, D.; O'Connor, D. V.; Roberts, A. J.; Meech, S. R.; Standards for nanosecond fluorescence decay time measurements; *Anal.Chem.*; **1983**, 55, 1, 68-73.
- 153.... Lee, E. D.; Werner, T. C.; Seitz, W. R.; Luminescence ratio indicators for oxygen; *Anal.Chem.*; **1987**, 59, 2, 279-283.
- 154.... Lev, O.; Diagnostic applications of organically doped sol-gel porous glass; *Analusis*; **1992**, 20, 543-553.
- 155.... Levy, A. C.; Taylor, C. R.; Fibers, optical; *Encyclopedia of polymer science and engineering*; N. Y.; Wiley-interscience; **1985**, 7, 1-15.
- 156.... Lewis, D. V.; Schuette, W. H.; *J.Neurophysiol.*; **1975**, 38, 405-417.

- 
- 157.... **Li, J.; Humphrey, A. E.;** Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor; *Biotechnol.Tech.*; **1991**, 37, 1043-1049.
- 158.... **Lieberman, R. A.; Blyler, L. L.; cohen, L. G.;** A distributed fiber optic sensor based on cladding fluorescence; *J.Lightwave Technol.*; **1990**, 8, 2, 212-220.
- 159.... **Lifermann, J.;** Les systèmes discrets; Paris; Masson; **1975**,
- 160.... **Lippitsh, M. E.; Pusterhofer, J.; Leiner, M. J. P.; Wolfbeis, O. S.;** Fibre-optic oxygen sensor with the fluorescence decay time as the information carrier; *Anal.Chim.Acta*; **1988**, 205, 1-6.
- 161.... **Liu, J. N.; Shahriari, M. R.; Sigel, G. H.;** Development of a porous polymer pH optrode; *Opt.Lett.*; **1992**, 17, 24, 1815-1817.
- 162.... **Livesey, A. K.; Brochon, J. C.;** Analysing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method; *Biophys. J.*; **1987**, 52, 693-706.
- 163.... **Llinas, R.;** Electrophysiology of pars compacta cells in the in vitro substantia nigra -a possible mechanism for dendritic release; *Brain Research*; **1984**, 294, 127-132.
- 164.... **Louch, J.; Ingle, J. D.;** Experimental comparison of single- and double-fiber configurations for remote fiber-optic fluorescence sensing; *Anal.Chem.*; **1988**, 60, 22, 2537-2540.
- 165.... **Lübbbers, D. W.; Opitz, N.;** Optical fluorescence sensors for continuous measurement of chemical concentrations in biological systems; *Sensors and Actuators*; **1983**, 4, 641-654.
- 166.... **Mabuchi, H.; Nakahashi, H.;** Liquid-chromatographic profiling of endogenous fluorescent substances in sera and urine of uremic and normal subjects; *Clin.Chem*; **1983**, 29, 4, 675-677.
- 167.... **MacIlwain, H.;** Biochemistry and the central nervous system; Londre; Churchill, J.&A.,LTD.; **1959**, 110 & 140-143 & 256.
- 168.... **MacLaren, A. D.; Shugar, D.;** Photochemistry of proteins and nucleic acids; Londre; Pergamon Press; **1964**,
- 169.... **Macneil, J. D.; Hausler, M.; Frei, R. W.; Hutzinger, O.;** Characterization of indoles by thin-layer chromatography and in situ fluorometry; *Anal. Biochem.*; **1972**, 45, 100-106.
- 170.... **Maickel, R. P.; Cox, R. H.; Saillant, J.; Miller, F. P.;** A method for the determination of serotonin and norepinephrine in discrete areas of rat brain; *Int.J.Neuropharmacol.*; **1968**, 7, 275-281.
- 171.... **Makishima, A.; Tani, T.;** Preparation of amorphous silicas doped with organic molecules by the sol-gel process; *J.Am.Ceram.Soc.*; **1986**, 69, 4, c-72-74.
- 172.... **Marinesco, S.;** Etude des mécanismes serotoninergiques mis en jeu au niveau du noyau arqué du rat pour quatre antidépresseurs. Evaluation des effets qu'ils induisent sur les états de vigilance.; DEA de neuroscience; Villeurbanne; Univ. Cl. Bernard Lyon I; **1993**, 32.
- 173.... **Matsuzawa, S.; Wakisaka, A.; Tamura, M.;** Use of solid carbon dioxide to alleviate fluorescence quenching by oxygen; *Anal.Chem.*; **1990**, 62, 23, 2654-2656.

- 174.... Matsui, T.; Suzuki, K.; Sakagami, M.; Kitamori, T.; A correction method for fluorescence reduction using time-resolved fluorometry and spectrophotometry; *Appl.Spectrosc.*; **1991**, 45, 1, 32-35.
- 175.... Mayevsky, A.; Jamieson, D.; Chance, B.; Oxygen poisoning in the unanesthetized brain: correlation of the oxydation-reduction state of pyridine nucleotide with electrical activity; *Brain Research*; **1974**, 76, 481-491.
- 176.... Mayevsky, A.; Chance .B.; Metabolic responses of the awake cerebral cortex to anoxia hypoxia spreading depression and epileptiform activity; *Brain Research*; **1975**, 98, 149-165.
- 177.... Mayevsky, A.; Chance, B.; Intracellular oxydation-reduction state measured *in situ* by a multichannel fiber-optic surface fluorometer; *Science*; **1982**, 217, 6, 537-540.
- 178.... McCann, B. P.; De Hart, T. G.; Krohn, D. A.; Medical diagnosis and therapy tap the talents of optical fiber; *Photonics Spectra*; **1991**, 25, 3, 85-91.
- 179.... McFarlane, R.; Hamilton, M. C.; A fluorescence based dissolved oxygen sensor; *Proc SPIE-int soc. opt. Eng.*; **1987**, 798, 324-330.
- 180.... McGeer, P. L.; Eccles, J. C.; McGeer, E. G.; The serotonin neuron; *Molecular neurobiology of the mammalian brain*; N.Y.; Plenum Press; **1978**,
- 181.... McGinty, D. J.; Harper, R. M.; Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleeps in cats; *Brain Research*; **1976**, 101, 569-575.
- 182.... Miller, W. W.; Yafuso, M.; Yan, C. F.; Hul, H. K.; Arick, S.; Performance of an *in-vivo*, continuous blood-gas monitor with disposable probe; *Clin.Chem*; **1987**, 33, 9, 1538-1542.
- 183.... Miro, L.; Effets tissulaires du laser; *Angéiologie*; **1985**, XXXVII, 1, 29-36.
- 184.... Mitchell, D. G.; Garden, J. S.; Aldous, K. M.; Fiber optic filter fluorometer for improved analysis of absorbing solutions; *Anal.Chem.*; **1976**, 48, 14, 2275-2277.
- 185.... Miya, T.; Terunuma, Y.; Hosaka, T.; Miyashita, T.; Ultimate low-loss single-mode fibre at 1.55 $\mu$ m; *Progress in optical communications*; Clarricoats, P. J. B.; Stevenage,U.K.; Peter Peregrinus Ltd.; **1980**, 115-116.
- 186.... Moretti, M.; Fiberoptic sensors evolve into medical products; *Laser Focus*; **1987**, 23, 5, 118-120.
- 187.... MorenoBondi, M. C.; Wolfbeis, O. S.; Leiner, M. J. P.; Scaffar, B. P. H.; Oxygen optrode for use in a fiber-optic glucose biosensor; *Anal.Chem.*; **1990**, 62, 21, 2377-2380.
- 188.... Mottin, S.; Tran-Minh, C.; Laporte, P.; Cespuglio, R.; Jouvét, M.; Fiber-optic time-resolved fluorescence sensor for *in vitro* serotonin determination; *Appl.Spectrosc.*; **1993**, 47, 5, 590-597.
- 189.... Murray, R. W.; Sensors based on optical measurements; *Chemical sensors and microinstrumentation*; Dessy, R. E.; Heineman, W. R.; Janata, J.; Seitz, W. R.; Washington DC; American Chemical Society; **1989**, chap. 17-25, 248-397.
- 190.... Narayanaswamy, R.; Sevilla, F.; Optical fibre sensors for chemical species; *J.Phys.E:Sci.Instrum.*; **1988**, 21, 10-17.

- 191.... Nowak, S. A.; Lytle, F. E.; Rapid, quantitative measurements using time-correlated single-photon counting and time-filtered detection; *Appl.Spectrosc.*; **1991a**, 45, 5, 728-733.
- 192.... Nowak, S. A.; Basile, F.; Kivi, J. T.; Lytle, F. E.; Fast collection times for fluorescence-decay measurements; *Appl.Spectrosc.*; **1991b**, 45, 6, 1026-1030.
- 193.... Nowicki, J. P.; Jourdain, D.; MacKenzie, E. T.; NADH fluorescence in vivo: changes in cerebral oxidative metabolism and perfusion induced by pentobarbital, indomethacin and salicylate; *J.Cereb.Blood Flow Metab.*; **1987**, 7, 3, 280-288.
- 194.... OConnor, D. V.; Phillips, D.; Time-correlated single photon counting; London, U.K.; Academic Press; **1984**,
- 195.... Opitz, N.; Lübbers, D. W.; Biosensors international workshop; Schmid, R. D.; VCH; **1987**, 10, 207-216.
- 196.... Orofino, T. A.; Unterleitner, F. C.; Optical fibers for dispersion in the time domain; *Applied Optics*; **1976**, 15, 8, 1907-1909.
- 197.... Oshino, N.; Sugano, T.; Oshino, R.; Chance, B.; Mitochondrial function under hypoxic conditions: the steady states of cytochrome a+a<sub>3</sub> and their relation to mitochondrial energy states; *Biochim.Biophys.Acta*; **1974**, 368, 298-310.
- 198.... Parker, J. W.; Cox, M. E.; Glucose/oxygen sensor; *Proc SPIE-opt. Fib. Med. II*; **1986**, 713, 113-120,
- 199.... Parsa, P.; Jacques, S. L.; Nishioka, N. S.; Optical properties of rat liver between 350 and 2200nm; *Applied Optics*; **1989**, 28, 12, 2325-2330.
- 200.... Patterson, M. S.; Chance, B.; Wilson, B. C.; Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties; *Applied Optics*; **1989**, 28, 12, 2331-2336.
- 201.... Paxinos, G.; Watson, C.; The rat brain in stereotaxic coordinates; N.Y., Paris, London; Academic Press; **1983**, 85.
- 202.... Pease, J. S.; Wang, J. C.; Signal recovery with PMT using photon counting, lock-in detection and boxcar averaging; Sunnyvale, Californie, USA; **1988**,
- 203.... Peterson, J. I.; Goldstein, S. R.; Fitzgerald, R. V.; Buckhold, D. K.; Fiber optic pH probe for physiological use; *Anal.Chem.*; **1980**, 52, 864-869.
- 204.... Peterson, J. I.; Vurek, G. G.; Fiber optic sensors for biomedical applications; *Anal.Chem.*; **1984**, 56, 4, 123-127.
- 205.... Peterson, J. I.; Fitzgerald, R. V.; Buckhold, D. K.; Fiber-optic probe for *in vivo* measurement of oxygen partial pressure; *Anal.Chem.*; **1984b**, 56, 62-67.
- 206.... Peterson, J. I.; Stefansson, E.; Fiber optic oxygen sensor; Biosensors international workshop; Schmid, R. D.; VCH; **1987**, 10, 235-241.
- 207.... Petruska, J.; Changes in the electronic transitions of aromatic hydrocarbons on chemical substitution: Part 1 and 2; *J.Chem.Phys.*; **1961**, 34, 4, 1111-1136.
- 208.... Petrea, R. D.; Sepaniak, M. J.; Vo-Dinh, T.; Fiber-optic time-resolved fluorimetry for immunoassays; *Talanta*; **1988**, 35, 2, 139-144.
- 209.... Platt, J. R.; Classification of spectra of cata-condensed hydrocarbons; *J.Chem.Phys.*; **1949**, 17, 5, 484-495.

- 210.... **Platt, J. R.**; Spectroscopic moment: a parameter of substituent groups determining aromatic UV intensities; *J.Chem.Phys.*; **1951**, 19, 3, 263-271.
- 211.... **Plescher, A.**; Drug-induced alterations of monoamine metabolism; The clinical chemistry of monoamines; Manchester; **1962**, 191-203.
- 212.... **Pope, E. J. A.**; **Mackenzie, J. D.**; Incorporation of organic dyes in polymer/oxide composites; *MRS bulletin*; **1987**, 2, 29-31.
- 213.... **Posch, H. E.**; **Wolfbeis, O. S.**; Fiber-optic humidity sensor based on fluorescence quenching; *Sensors and Actuators*; **1988**, 15, 77-83.
- 214.... **Preuss, L. E.**; **Profio, A. E.**; Optical properties of mammalian tissue: introduction by feature editors; *Applied Optics*; **1989**, 28, 12, 2207-2209.
- 215.... **Radulovacki, M.**; Comparison of effects of paradoxical sleep deprivation and immobilisation stress on 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid; *Brain Research*; **1973**, 60, 255-258.
- 216.... **Rapport, M. M.**; **Green, A. A.**; **Page, I. H.**; Purification of substance which is responsible for vasoconstrictor activity of serum; *Fed.Proc*; **1947**, 6, 184.
- 217.... **Regnault, W. F.**; **Picciolo, G. L.**; Review of medical biosensors and associated materials problems; *J.Biomed.Mater.Res.:Applied Biomaterials*; **1987**, 21, A2, 163-180.
- 218.... **Reinhard, J. F.**; **Wurtman, R. J.**; Relation between brain 5-HIAA levels and the release of serotonin into brain synapses; *Life Sciences*; **1988**, 21, 1741-1746.
- 219.... **Renault, G.**; **Raynal, E.**; **Sinet, M.**; **Berthier, J. P.**; **Cornillaut, J.**; **Godard, B.**; **Muffat-Joly, M.**; **Valois, J. M.**; Réalisation d'un appareillage destiné à l'étude instantanée du métabolisme cardiaque in vivo; **1982**,
- 220.... **Renault, G.**; **Raynal, E.**; **Sinet, M.**; **Muffat-Joly, M.**; **Berthier, J. P.**; **Cornillaut, J.**; **Godard, B.**; **Pocidallo, J. J.**; In situ double-beam NADH laser fluorimetry: choice of a reference wavelength; *Am.J.Physiol.*; **1984**, 15, H491-H499.
- 221.... **Renault, G.**; Clinical applications of laser fluorometer; *Lasers&optonics*; **1987a**, dec, 56-59.
- 222.... **Ridley, J.**; **Zerner, M.**; An Intermediate Neglect of Differential Overlap technique for Spectroscopy: Pyrrole and Azines; *Theoret. Chim. Acta (Berl)*; **1973**, 32, 11-134.
- 223.... **Rivail, J. L.**; Elements de chimie quantique à l'usage des chimistes; Paris; CNRS; **1989**,
- 224.... **Ronot, C.**; **Archenault, M.**; **Goure, J. P.**; **Gagnaire, H.**; **Jaffrezic-Renault, N.**; **Pichery, T.**; Detection of chemical vapors with especially coated optical fibre sensor; *Sensors and Actuators*; **1993**, 11, 373-381.
- 225.... **Russo, R. E.**; **Hieftje, G. M.**; A new instrument for time-resolved-reduction of scattered radiation in fluorescence measurements; *Anal.Chim.Acta*; **1982**, 134, 13-19.
- 226.... **Sakaki, T.**; **Sogo, A.**; **Wakahara, A.**; **Kanai, T.**; **Fujiwara, T.**; **Tomita, K.**; The crystal and molecular structures of 1:1 molecular complexes between tryptophan metabolites—5-MIAA:5-MT and IAA:5-MT; *Acta Cryst.*; **1976**, B32, 3235-3242.

- 227.... Sallanon, M.; Denoyer, M.; Jouvét, M.; Serotonine et sommeil; Etat de veille et de sommeil; Meyer, P.; Elghozi, J. L.; Salva, A. Q.; Paris; Masson; **1989**, 7, 36-47.
- 228.... Sandorfy, C.; Les spectres électroniques en chimie théorique; Paris; Revue d'optique théorique et instrumentale; **1959**,
- 229.... Schaffar, B. P. H.; Wolfbeis, O. S.; A fast responding fiber optic glucose biosensor based on an oxygen optrode; Biosensors; **1990**, 5, 137-148.
- 230.... Schnitzger, H.; Scholtz, R.; Bücher, T.; Lübbers, D. W.; Comparative fluorometric studies on rat liver in vivo on isolated, perfused, hemoglobin-free liver; Biochem.Z.; **1965**, 341, 334-339.
- 231.... Schneckenburger, H.; König, K.; Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators; Opt. Eng.; **1992**, 31, 7, 1447-1451.
- 232.... Schuller, E.; Les protéines du LCR et les maladies immunitaires du système nerveux; Paris; Institut Behring, J.B. Bailliere; **1981**,
- 233.... Schultz, J. S.; Medical applications of fiber optic sensors; Medical Instrumentation; **1985**, 19, 4, 158-163.
- 234.... Schultz, J.; Les biocapteurs; Pour la Science; **1991**, 168, 90-95.
- 235.... Seitz, W. R.; CRC critical reviews in analytical chemistry; Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics; N.Y.; **1988**, 19, 2, 136-173.
- 236.... Seitzinger, N. K.; Hugues, K. D.; Lytle, F. E.; Optimisation of signal-to-noise ratios in time-resolved fluorescence detection; Anal.Chem.; **1989**, 61, 23, 2611-2615.
- 237.... Sepaniak, M. J.; Tromberg, B. J.; Eastham, J. F.; Optical fiber fluoroprobes in clinical analysis; Clin.Chem; **1983**, 29, 9, 1678-1682.
- 238.... ShenZeng; Xiao-Jian; Shu-Zhi, L.; Li-Hua, W.; Effects of a low power laser beam guided by optic fiber on rat brain striatal monoamines and amino acids; Neurosci.Lett.; **1982**, 32, 203-208.
- 239.... Siesjö, B. K.; Brain Energy Metabolism; **1978**, 138,179,187-196,202,258,266-270.
- 240.... Silberman D.; Fiberoptic sensors for medical diagnostics: an overview; Lasers&Optronics; **1988**, Oct., 73-77.
- 241.... Smith, R. M.; Jackson, K. W.; Aldous K.M.; Design and evaluation of a fiber optic fluorometric flow cell; Anal.Chem.; **1977**, 49, 3, 2051-2053.
- 242.... Snyder, A. W.; Love, J. D.; Optical waveguide theory; Londre; Chapman and Hall; **1983**, 32.
- 243.... Soper, S. A.; Mattingly, Q. L.; Vegunta, P.; Photon burst detection of single near-infrared fluorescent molecules; Anal.Chem.; **1993**, 65, 6, 740-747.
- 244.... Steinbush, H. W. M.; Serotonergic neurons in the central nervous system of the rat; Nijmegen; **1982**, 272-272.
- 245.... Stewart, J. J. P.; Optimization of parameters for semiempirical method; J.Comp.Chem.; **1989**, 10, 2, 209-264.

- 246.... **Stober, F.; Lichtenthaler, H. K.;** Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat; *J.Plant Physiol.*; **1992**, 140, 673-680.
- 247.... **Sugano, T.; Oshino, N.; Chance, B.;** Mitochondrial function under hypoxic conditions: the steady states of cytochrome c reduction and of energy metabolism; *Biochim.Biophys.Acta*; **1974**, 374, 340-358.
- 248.... **Suzuki, H.; Sugama, A.; Kojima, N.;** Miniature Clark-type oxygen electrode with a three-electrode configuration; *Sensors and Actuators B*; **1990**, 2, 297-303.
- 249.... **Swan, J. S.; Kragten, E. Y.; Veening, H.;** Liquid-chromatographic study of fluorescent materials in uremic fluids; *Clin.Chem*; **1983**, 29, 6, 1082-1084.
- 250.... **Szmecinski, H.; Lakowicz, J. R.;** Optical measurements of pH using fluorescence lifetimes and phase-modulation fluorometry; *Anal.Chem.*; **1993**, 65, 13, 1668-1674.
- 251.... **Takeushi, Y.;** Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain; *Neuronal Serotonin*; Osborne, N. N.; Hamon, M.; Chichester, U.K.; Wiley J. and Sons; **1988**, 25-56.
- 252.... **Tan, W.; Shi, Z. Y.; Kopelman, R.;** Development of submicron chemical fiber optic sensors; *Anal.Chem.*; **1992**, 64, 23, 2985-2990.
- 253.... **Testylier, G.; Gourmelon, P.;** Spectrophotometry in vivo, a technique for local and direct enzymatic assays: application to brain acetylcholinesterase; *Proc. Nat. Acad.Sci.USA*; **1987**, 84, 8145-8149.
- 254.... **Thewalt, U.; Bugg, C. E.;** The crystal and molecular structure of serotonin picrate monohydrate; *Acta Cryst.*; **1972**, B28, 82-92.
- 255.... **Thompson, J. H.; Spezia, C. A.; Angulo, M.;** Temperature and acidity for maximal fluorescence of serotonin and serotonin-O.P.T.; *Experientia*; **1969**, 25, 927-929.
- 256.... **Thompson, R. B.; Lakowicz, J. R.;** Fluorescence-based fiber-optic sensors; *Topics in fluorescence spectroscopy*; N.Y.; Plenum Press; **1991**, 2: *Principles*, 345-365.
- 257.... **Thompson, R. B.; Jones, E. R.;** Enzyme-based fiber optic zinc biosensor; *Anal.Chem.*; **1993a**, 65, 6, 730-734.
- 258.... **Thompson, R. B.; Lakowicz, J. R.;** Fiber optic pH sensor based on phase fluorescence lifetimes; *Anal.Chem.*; **1993b**, 65, 7, 853-856.
- 259.... **ThornEMI;** Photomultipliers Documentation; London, U.K.; **1986**,
- 260.... **TomasVert, F.; Ponce, C. A.; Estrada, M. R.; Silber, J.; Singh, J.; Anunciatta, J.;** Experimental and theoretical studies on the electronic spectra of indole-3-acetic acid and its anionic and protonated species; *J. Mol. Stuct.*; **1991**, 246, 203-215.
- 261.... **TranMinh, C.;** Les biocapteurs; Paris; Masson; **1991**,
- 262.... **Trettnak, W.; Leiner, M. J. P.; Wolfbeis, O. S.;** Fiber-optic glucose sensor with a pH optrode as the transducer; *Biosensors*; **1988**, 4, 15-26.
- 263.... **Trettnak, W.; Wolfbeis, O. S.;** A fiber optic lactate biosensor with an oxygen optode as the transducer; *Anal.Lett.*; **1989**, 22, 9, 2191-2197.
- 264.... **Tromberg, B. J.; Eastham, J. F.; Sepaniak, M. J.;** Optical fiber fluoroprobes for biological measurements; *Appl.Spectrosc.*; **1984**, 38, 1, 38-42.

- 265.... **Tsunoda, K.; Nomura, A.; Yamada, J.; Nishi, S.;** Pulsed laser-induced fluorescence detector for liquid chromatography with a fibre optic-based flow cell; *Anal.Chim.Acta*; **1990**, 229, 3-7.
- 266.... **Twarog, B. M.; Page, I. H.;** Serotonin content of some Mammalian tissues and urine and a method for its determination; *Amer.J.Comp.Neurol.*; **1953**, 175, 157-161.
- 267.... **Udenfriend, S.; Bogdanski, D. F.; Weissbach, H.;** Fluorescence characteristics of 5-HT; *Science*; **1955**, 122, 32-33 et 972-973.
- 268.... **Uematsu, D.; Greenberg, J. H.; Reivich, M.; Karp, A.;** Cytosolic free calcium, NAD/NADH redox state and hemodynamic changes in the cat cortex during severe hypoglycemia; *J.Cereb.Blood Flow Metab.*; **1989**, 9, 2, 149-155.
- 269.... **Varineau, P. T.; Duesing, R.; Wangen, L. E.;** Determination of uranyl in aqueous solutions using a fiber-optic-based, time-resolved luminescence sensor; *Appl.Spectrosc.*; **1991**, 45, 10, 1652-1655.
- 270.... **Vaughan, W. M.; Weber, G.;** Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water. A dynamic probe of the microenvironment; *Biochemistry*; **1970**, 9, 3, 464-473.
- 271.... **Velluti, R.;** An electrochemical approach to sleep metabolism: a pO<sub>2</sub> paradoxical sleep system; *Physiol. Behav.*; **1985**, 34, 355-358.
- 272.... **Velluti, R.;** A functional viewpoint on paradoxical sleep-related brain regions; *APPLA*; **1988**, 38, 99-115.
- 273.... **Vickers, G. H.; Miller, R. M.; Hieftje, G. M.;** Time-resolved fluorescence with an optical-fiber probe; *Anal.Chim.Acta*; **1987**, 192, 145-153.
- 274.... **Visser, A. J. W.G.; Van Hoek, A.;** The fluorescence decay of reduced nicotinamides in aqueous solution after excitation with a UV-mode locked Ar ion laser; *Photochem.Photobiol.*; **1981**, 33, 35-40.
- 275.... **Walfaren, G. E.; Fisher, M. R.; Hokmabadi, M. S.; Yang, W. H.;** Temperature dependence of the low- and high-frequency Raman scattering from liquid water; *J.Chem.Phys.*; **1986**, 85, 12, 6970-6982.
- 276.... **Warner, I. M.; McGown, L. B.;** Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry; *Anal.Chem.*; **1992**, 64, 12, 343R-352R.
- 277.... **Weiss, J. P.; Barlow, C. H.; Chance, B.;** Pentobarbital-induced reduction of pyridine nucleotide measured by surface fluorometry in perfused rat heart; *Biochem.Pharmacol.*; **1978**, 27, 1510-1511.
- 278.... **Weng, X. F.; Uchida, T.; Maeshima, M.; Minami, S.;** Fluorescence pattern analysis based on the time-resolved ratio method; *Appl.Spectrosc.*; **1991**, 45, 4, 560-565.
- 279.... **White, A.;** Effect of pH on fluorescence of tyrosine, tryptophan and related compounds; *Biochem. J.*; **1959**, 71, 217-220.
- 280.... **Whitten, W. B.; Ross, H. H.;** Fiber Optic Waveguides for the time-of-flight optical spectrometry; *Anal.Chem.*; **1979**, 51, 3, 417-419.
- 281.... **Wiklund, L.; Léger, L.; Persson, M.;** Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups; *J.Comp.Neurol.*; **1981**, 203, 613-647.

- 
- 282.... **Wirth, M. J.;** Ultrafast spectroscopy; *Anal.Chem.*; **1990**, 62, 4, 270A-277A.
- 283.... **Wolfbeis, O. S.; Offenbacher, H.; Kroneis, H.; Marsoner, H.;** A fast responding fluorescence sensor for oxygen; *Mikrochim.Acta*; **1984**, I, 153-158.
- 284.... **Wolfbeis, O. S.; Schulman, S. G.;** The fluorescence of organic natural products; *Molecular Luminescence Spectroscopy, method and applications: Part 1*; New-York; Wiley J. & sons; **1985**, 77, 167-370.
- 285.... **Wolfbeis, O. S.; Leiner, M.;** Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization; *Anal.Chim.Acta*; **1985b**, 167, 203-215.
- 286.... **Wolfbeis, O. S.; Leiner, M. J. P.; Posch, H. E.;** A new sensing material for optical oxygen measurement, with the indicator embedded in an aqueous phase; *Mikrochim.Acta*; **1986**, III, 359-366.
- 287.... **Wolfbeis, O. S.; Schulman, S. G.;** Fiber optical fluorosensors in analytical and clinical chemistry; *Molecular Luminescence Spectroscopy, Part2*; N.Y.; Wiley-interscience; **1988**, 77, 129-281.
- 288.... **Wolfbeis, O. S.; Weis, L. J.; Leiner, M. J. P.; Ziegler, W. E.;** Fiber-optic fluorosensor for oxygen and carbon dioxide; *Anal.Chem.*; **1988b**, 60, 19, 2028-2030.
- 289.... **Yamanaka, T.; Takahashi, Y.; Kitamura, T.; Uchida, K.;** Excimer formation of hydrocarbons doped in amorphous silica glasses; *J.Luminesc.*; **1991**, 48&49, 265-268.
- 290.... **Yarborough, J. M.;** Taking the confusion out of matching medical lasers to applications; *Photonics Spectra*; **1992**, 26, 10, 88-93.
- 291.... **Zhu, Z. Y.; Yappert, M. C.;** Determination of effective depth and equivalent pathlength for a single-fiber fluorometric sensor; *Appl.Spectrosc.*; **1992**, 46, 6, 912-918.





ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE  
DES MINES DE SAINT-ETIENNE

N° ORDRE: 98CD

Nom : MOTTIN, Stéphane

**Sujet : Mise au point chez le rat d'un capteur à fibre  
optique pour la mesure de la fluorescence résolue  
en temps induite par laser et émise par le cerveau.  
*Application au cycle veille-sommeil.***

**Spécialité : GÉNIE DES PROCÉDÉS**

**Mots clés : Fluorescence résolue en temps, capteur chimique  
à fibre optique, mesure *in vivo*, sérotonine,  
NADH, noyau du raphé, neurochimie, sommeil  
paradoxal.**

**Résumé :** La mesure *in vitro* de la sérotonine (5-HT) est effectuée par un capteur chimique à fibre optique (FOCS) par fluorescence induite par laser et résolue en temps. Les propriétés photophysiques de la 5-HT sont analysées: un état émissif de la 5-HT non décrit par la littérature a été mis en évidence. L'ordre de grandeur de la limite de détection de 5-HT est de  $5\mu\text{M}$ , bien loin des concentrations cérébrales *in vivo* ( $\approx 1\text{nM}$ ).

Les mesures *in vivo* au niveau du cortex (Cx) et du noyau du raphé dorsalis (nRD) chez le rat non anesthésié et libre de ces mouvements sont réalisées par ce même FOCS. En considérant les analyses photophysiques du liquide céphalo-rachidien, les composés biochimiques mesurés semblent être situés dans le compartiment intracellulaire. Deux pics de fluorescence ont été déterminés au niveau du Cx et nRD: un situé à 390 nm et l'autre centré sur 460 nm. Le premier pic (390 nm) n'a pas encore d'attribution moléculaire sûre et n'est pas dû uniquement à la 5-HT. Les données spectroscopiques et la littérature de l'autofluorescence des tissus cérébraux permettent une attribution moléculaire fiable du pic mesuré à 460nm: il provient du NADH endogène. Quelques résultats préliminaires ont été obtenus avec le FOCS développé dans les deux structures cérébrales pendant les divers états de vigilance. Au niveau du nRD dans la partie antérieure et ventrale, une augmentation de la fluorescence (460nm) a été observée lors du sommeil à onde lente (SWS) et du sommeil paradoxal (PS). En outre une augmentation importante et très rapide de la fluorescence (460nm) a été mesurée lors de la mort de l'animal.