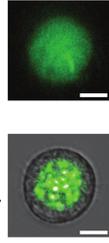
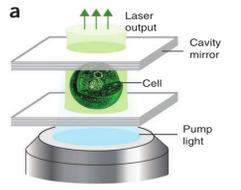


## Utilisation de la fluorescence dans l'imagerie biologique

La détection par fluorescence est un procédé couramment utilisé en biologie pour localiser et quantifier une molécule d'intérêt (protéine, acide nucléique...) dans un tissu, une cellule. Les fluorophores employés dans ce domaine sont généralement des molécules organiques ou des protéines fluorescentes. Ce travail a été initié par les études de Gather *MC et al.* qui ont montré la possibilité de créer des biolasers à partir de cellules exprimant des protéines fluorescentes dans une cavité de type Fabry Perot (figure ci-contre). D'autres études ont montré la possibilité d'obtenir de l'émission stimulée dans des objets biologiques désordonnés (tissus trempés dans le Rhodamine) pour obtenir des lasers aléatoires (Song *Q et al.*).



Dans le même objectif notre équipe a montré qu'il était possible d'obtenir une amplification de fluorescence à partir de cellules en ajoutant des diffuseurs dans le milieu (particules de dioxyde de titane directement ajoutées en solution, thèse S. Bonnefond). Ce stage s'appuie sur ces travaux préliminaires et la description d'un système de micro-canal en capable de créer un laser aléatoire microfluidique pour la cytométrie (He *et al.*). Notre objectif est de créer une cavité microfluidique diffusante en englobant les diffuseurs dans la structure du canal.

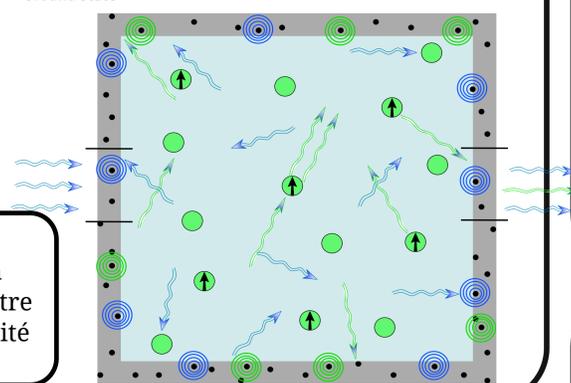
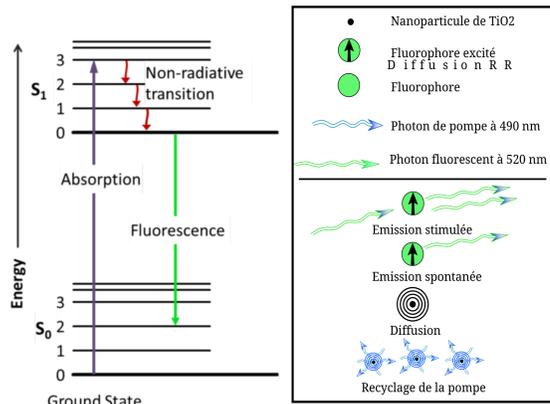


## Passage de l'émission spontanée à l'émission stimulée dans un milieu désordonné

Les diffuseurs présents dans la cavité permettent le recyclage de la pompe d'excitation et des photons fluorescents, c'est à dire l'allongement du chemin optique des photons dans la cavité. Ceci augmente à la fois le nombre de fluorophores excités et la probabilité d'avoir des photons de même énergie, déclencheurs d'une émissions stimulée.

Celle-ci favorisant certaines transitions radiatives, ceci entraîne l'apparition de pics fins dans le spectre spontané. Lorsque le seuil laser est franchi, une seule transition devient prépondérante et a pour conséquence un rétrécissement du spectre d'émission de fluorescence pour n'obtenir qu'une seule raie.

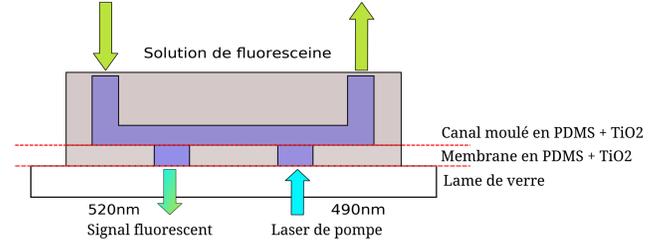
L'effet d'un passage à l'émission stimulée est de permettre au fluorophore d'effectuer un plus grand nombre de cycles excitation/émission.



### Indicateurs à rechercher :

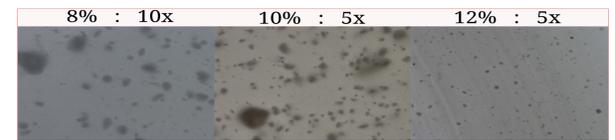
- Augmentation de l'intensité @520nm
- Rétrécissement de la largeur du spectre
- Apparition de multiples pics d'intensité irréguliers

## Structure du canal microfluidique



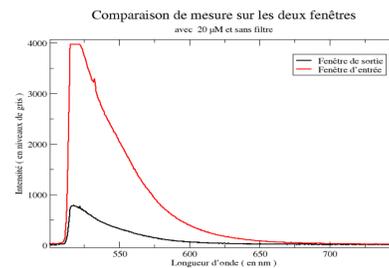
Les canaux sont réalisés en trois couches collées par traitement de surface au plasma :  
 - La première couche en PDMS est épaisse et directement moulée dans les moules des canaux, elle est percée pour y faire circuler la solution.  
 - La deuxième en PDMS est une fine membrane et sert à piéger la lumière dans le canal, une ou plusieurs fenêtres sont percées pour laisser entrer et sortir les photons.  
 - La dernière est une lame en verre qui sert à fermer le canal au niveau des fenêtres et les rendre étanches.

Les parois en PDMS contiennent des nanoparticules de dioxyde de titane de dia, qui diffusent les photons et allongent le chemin optique de la pompe et des photons fluorescents dans le canal, elles semblent contenir des agrégats.



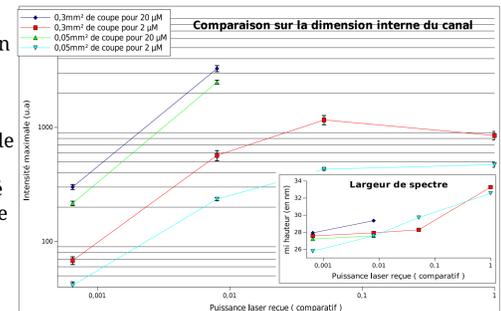
Observation d'agrégats ou impuretés sur une des faces des membranes.

## Mesures d'amplification pour différentes configurations



Spectre d'émission de la fluorescéine (maximum @ 520 nm). Les spectres sont traités pour extraire automatiquement leur maxima et leur largeur à mi-hauteur

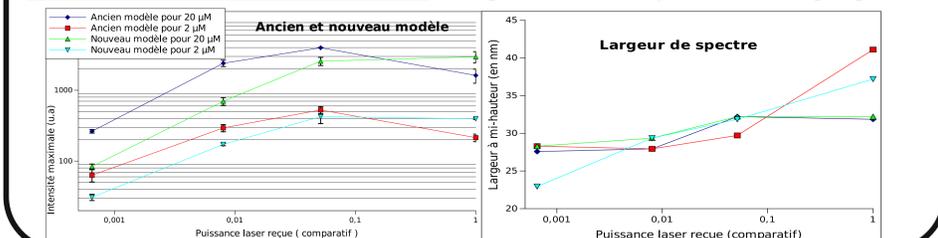
Deux type de canaux ont été réalisés ( $e \times l$ ) : 0,1x0,5x14mm et 0,3x1x14mm. L'amplification est plus importante avec les canaux les plus épais, d'autant plus pour de faibles concentrations en fluorescéine. Etant donné qu'il n'y a pas de modifications significatives de la largeur du spectre (30 nm de largeur à mi-hauteur), le régime d'émission reste spontané et l'intensité est proportionnelle au volume de sonde excitée.



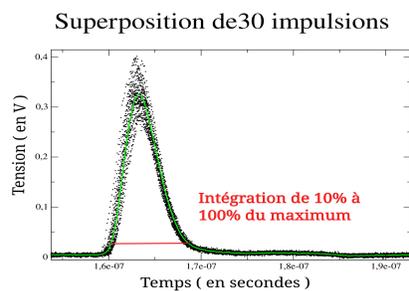
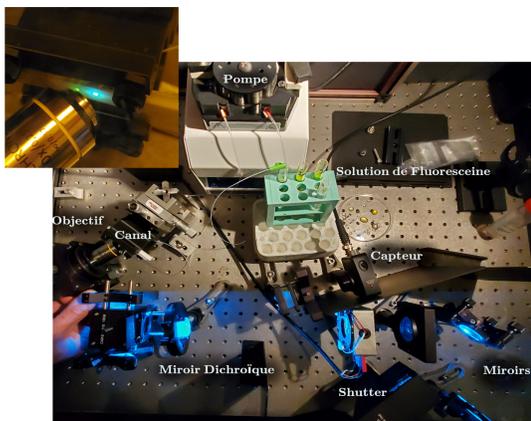
Ancien modèle :  
 - canal en 3 couches  
 - 0% au-dessus du canal  
 - canal 12%  
 - membrane 12%  
 - fenêtres plus écartées

Nouveau modèle :  
 - canal en 2 couches  
 - canal 10%  
 - membrane 10%  
 - fenêtres moins écartées

Influence de l'écartement des fenêtres d'injection laser/détection : la quantité de signal de fluorescence détectée diminue avec l'écartement. Les canaux de première génération, plus concentrés en TiO<sub>2</sub> ont une efficacité plus importante avec l'augmentation de la pompe.

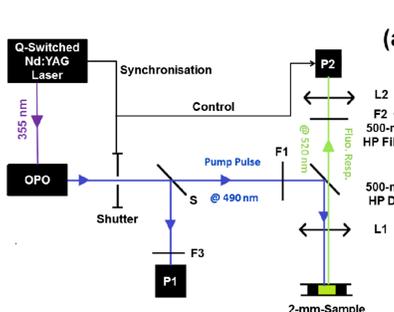


## Montage expérimental



## Description du montage

Un laser Nd:YAG @355nm couplé avec un Oscillateur Paramagnétique Optique accordable génère des impulsions de 5 ns à 490 nm avec une fréquence de 10 Hz. Une fraction du faisceau est dirigé sur une photodiode de mesure et les 85% du laser sont focalisés sur le dispositif microfluidique par une lentille. La lame contenant le canal est disposée sur un berceau YZ afin d'ajuster sa position par rapport au faisceau. Une pompe péristaltique permet de faire circuler une solution de fluorescéine dans le canal. L'émission de fluorescence est collectée par un objectif 10x/0.25 monté sur un berceau 3 axes (YZ+tilt). La mesure est effectuée par un spectromètre USB2000 relié par fibre à l'objectif.



## Une multiplicité de paramètres

Ce projet nécessite de jouer sur une multitude de paramètres qu'il est difficile de faire varier individuellement.

- Energie de la pompe
- Pourcentage de TiO<sub>2</sub> dans le PDMS
- Forme, position et nombre des fenêtres d'injection laser et mesure de l'émission
- Géométrie du canal micro-fluidique

## La reproductibilité

Le positionnement des éléments du montage a besoin d'être fiabilisé : injection du laser de pompe dans le canal, recueil de l'émission de fluorescence via l'objectif de détection. La fraction du laser de pompe pénétrant effectivement dans le canal est difficile à évaluer, il est uniquement possible de réaliser des comparaisons inter-mesures. Une solution consisterait à rigidifier le montage et à évaluer l'énergie envoyée sur l'échantillon, en mesurant les impulsions envoyées grâce à la photodiode disponible pour cela.

## Perspectives d'améliorations

- Optimiser :
  - \* les fenêtres d'injection laser et recueil de l'émission (taille, géométrie).
  - \* La focalisation et l'angle d'incidence du laser de pompe sur le canal.
- Standardiser la fabrication des canaux pour un placement reproductible sur le montage.
- Caractériser le laser traversant la lame de verre