



**Ambassade de France à Washington
Mission pour la Science et la Technologie**

4101 Reservoir Road, NW, Washington DC 20007

Tél. : +1 202 944 6249

Fax : +1 202 944 6219

Mail : publications.mst@ambafrance-us.org

URL : <http://www.ambafrance-us.org>

Domaine	: Biologie, photonique
Document	: Rapport de mission
Titre	: LA NANOBIPHOTONIQUE AUX ETATS-UNIS
Auteur(s)	: Drs : H. Rigneault ,D. Marguet, S Brasselet, A. Alexandrou, C. Boccara, V. Emiliani, C.Royer, L. Cognet : M. Guyader (AST, Los Angeles) R. Hérino (AST, Houston)
Date	: 25 novembre 2008
Contact SST	: Mireille Guyader : attache-sdv.mst@consulfrance-losangeles.org
Numéro	

Mots-clefs	: Biophotonique, nanotechnologies, imagerie, sondes biologiques.
Résumé	: En Mars 2008, une délégation d'experts français en Biophotonique s'est rendue aux Etats-Unis dans l'optique de faire le point sur les recherches menées dans les équipes choisies parmi les plus actives du secteur, d'établir des liens plus étroits avec les scientifiques américains concernés et d'explorer les possibilités de collaboration. Des ateliers ont été organisés dans la plupart des sites visités qui ont permis des échanges fructueux entre chercheurs et qui ont été complétés par des visites de laboratoires et de leurs équipements spécialisés. Ce compte rendu présente une description détaillée, site par site, des axes de recherche développés par les professeurs qui ont accueilli la délégation, complétée dans une deuxième partie par un bilan synthétique organisé autour des principaux domaines concernés: 1) les études au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire, 2) les outils utilisés, en imagerie, photo-activation, manipulation et détection de molécules individuelles, 3) le développement de nouvelles sondes biologiques

NB : Toutes nos publications sont disponibles auprès de l'Agence pour la Diffusion de l'Information Technologique (ADIT), 2, rue Brûlée, 67000 Strasbourg (<http://www.adit.fr>).

AMBASSADE DE FRANCE AUX Etats-Unis
MISSION POUR LA SCIENCE ET LA TECHNOLOGIE
Consulat Général de France à Los Angeles
Consulat Général de France à Houston

COMPTE RENDU DE LA MISSION

organisée sur la thématique

LA NANOBIPHOTONIQUE AUX ETATS-UNIS

16 – 22 mars 2008

Rédigé par :

les missionnaires

Dr Hervé Rigneault (Institut Fresnel, Marseille)
Dr Didier Marguet (CIML, Marseille)
Dr Sophie Brasselet (Institut Fresnel, Marseille)
Dr Antigoni Alexandrou (Polytechnique, Palaiseau)
Dr Claude Boccara (ESPCI, Paris)
Dr Valentina Emiliani (Paris V)
Dr Catherine Royer (Montpellier)
Dr Laurent Cognet (Bordeaux)

les attachés scientifiques de Los Angeles et Houston :

Mireille Guyader (secteur Sciences de la Vie, Los Angeles)
Roland Hérino (secteur Sciences Physiques et Nanotechnologies, Houston)

RESUME

En Mars 2008, une délégation d'experts français en Biophotonique s'est rendue aux Etats-Unis dans l'optique de faire le point sur les recherches menées dans les équipes choisies parmi les plus actives du secteur, d'établir des liens plus étroits avec les scientifiques américains concernés et d'explorer les possibilités de collaboration. Des ateliers ont été organisés dans la plupart des sites visités qui ont permis des échanges fructueux entre chercheurs et qui ont été complétés par des visites de laboratoires et de leurs équipements spécialisés. Ce compte rendu présente une description détaillée, site par site, des axes de recherche développés par les professeurs qui ont accueilli la délégation, complétée dans une deuxième partie par un bilan synthétique organisé autour des principaux domaines concernés: 1) les études au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire, 2) les outils utilisés, en imagerie, photo-activation, manipulation et détection de molécules individuelles, 3) le développement de nouvelles sondes biologiques.

I- Introduction

La biologie fait de plus en plus appel aux nouveaux outils qu'offre le développement des nanotechnologies, en particulier dans le domaine de la photonique, aussi bien pour la recherche fondamentale que pour l'aide au diagnostic ou l'étude de nouvelles thérapies. Une nouvelle discipline est née de ces interactions: la Nanobiophotonique.

La Biophotonique peut se définir comme l'étude de l'interaction de la lumière (sous forme de photons d'énergie dans l'ultra-violet à l'infra-rouge) avec la matière biologique. La capacité d'imager, d'analyser et de manipuler les assemblages bio-moléculaires au niveau moléculaire, cellulaire, à tissulaire, de manière non-invasive devient essentielle à une meilleure compréhension des mécanismes régissant la santé humaine. La lumière vient apporter des fonctionnalités uniques dans la compréhension de ces processus et la biophotonique est maintenant considérée comme une science clé sur laquelle les futurs outils et instruments de recherche biomédicale seront fondés.

Les apports de la nanotechnologie à la biophotonique sont immenses. Plusieurs thématiques sont concernées, comme l'étude de nanoparticules et quantum dots pour l'imagerie biomédicale, les pinces optiques pour la manipulation de macromolécules biologiques, les moteurs moléculaires, la détection et/ou spectroscopie de molécules uniques, la spectroscopie à corrélation de fluorescence et l'imagerie par absorption à 2 photons, ou encore la plasmonique et les cristaux photoniques pour la création de nouveaux substrats, etc.

Les Etats-Unis et la France bénéficiant d'équipes de renom international dans ces différents domaines, la Mission pour la Science et la Technologie de l'Ambassade de France, avait inscrit à sa programmation 2008 l'invitation d'une délégation d'experts français développant des projets « Nanobiophotonique » dans le but de promouvoir la recherche française dans ce domaine, et de permettre un rapprochement entre les principaux acteurs des deux pays et ainsi favoriser le développement de nouvelles collaborations et d'échanges scientifiques.

Du 16 au 22 Mars 2008, une délégation d'experts français, accompagnée des attachés scientifiques de Los Angeles et de Houston, a visité les centres de recherche les plus réputés du domaine aux Etats-Unis, à Harvard University (Cambridge), Columbia University (New York City), University of California (UC) Davis (Sacramento), UC Berkeley, Stanford University (San Francisco) et UC Irvine. Les lieux visités sont indiqués sur la figure 1.

La première partie de ce rapport donne une description détaillée site par site des visites effectuées ainsi que des exposés qui ont eu lieu lors des différents ateliers. La deuxième partie donne les principales conclusions des membres de la délégation en fonction des thématiques abordées lors des visites et tend à faire le point sur l'état d'avancement des recherches dans le domaine de la Nanobiophotonique aux Etats-Unis en comparaison avec ce qui se fait en France.



Figure 1 : Universités visitées

II- Compte rendu des visites

- **Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University (Cambridge, MA)**

Le point fort de cette visite a été la table ronde organisée par Sunny Xie au Department of Chemistry de Harvard en présence de Xiawei Zhuang (Harvard), Antoine van Oijen (Harvard Medical School), Amit Meller (Boston University) et James Fujimoto (Massachusetts Institute of Technology), au cours de laquelle les participants américains et français ont présenté les principaux axes de leurs recherches. On trouvera ci-dessous les résumés des interventions des chercheurs américains.

James. Fujimoto – Massachusetts Institute of Technology *Optical Coherence Tomography*

Le groupe de James Fujimoto mène une recherche centrée sur le développement de nouveaux lasers à impulsions très brèves ainsi que sur la méthode dite OCT (Optical Coherence Tomography), et c'est essentiellement sur ce second point qu'il s'est exprimé. L'OCT est une méthode qui connaît un réel succès dans le domaine médical ainsi que pour l'aspect industriel. En médecine, le champ visé est celui des diagnostics rétiniens (dégénérescence maculaire, décollements précoces liés au diabète ou au glaucome par exemple), Le diagnostic pour d'autres parties du corps (peau, pièces d'anatomopathologie etc.) nécessite une résolution subcellulaire que ne possède en général pas l'OCT traditionnelle, mais qui est cependant possible en OCT plein champ.

Soulignons que dans le cadre de cette mission principalement focalisée sur les avancées en recherche et peu sur le *développement*, la description de la recherche translationnelle développée par J. Fujimoto était particulièrement intéressante. Dans le secteur de l'ophtalmologie, la pénétration du marché est de l'ordre de 20% pour la société Zeiss avec laquelle travaille J. Fujimoto et qui domine largement le marché, mais la concurrence est de plus en plus sévère, par exemple avec Topcon (installée aux USA pour l'OCT).

La qualité des montages de recherche en terme de résolution ("sectionning ability" ou finesse de coupe), de rapport signal-sur-bruit et surtout de vitesse est impressionnante. Pour ce qui est de la résolution, J. Fujimoto a souligné que la méthode dite "plein champ" qui est utilisée à l'ESPCI est la plus performante et qu'une collaboration serait la bienvenue.

Amit Meller – Department of Physics - Boston University

Single molecule biophysics and nanobiotechnology

La recherche du groupe d'Amit Meller est orientée autour des études du comportement des acides nucléiques (et de leurs complexes protéiques) à l'échelle de la molécule unique. Il nous a présenté un aspect de ce travail qui relève plus de l'innovation que de la recherche fondamentale, celui du séquençage ultra-rapide et ultra-parallèle de l'ADN par sa translocation voltage-dépendant à travers des micro-arrays de nanopores, dont le but est de réduire le coût de séquençage d'un génôme entier à \$1000. Des nanopores forment le fil conducteur (ou plutôt le trou conducteur) de toutes ses recherches, fondamentales et appliquées. Le séquençage rapide est basé sur la détection d'oligos complémentaires, marqués avec des fluorophores distincts par séquence dont les propriétés de fluorescence sont détectées quand les oligonucléotides sont physiquement dissociés de l'ADN génomique à séquencer en passant à travers le nanopore.

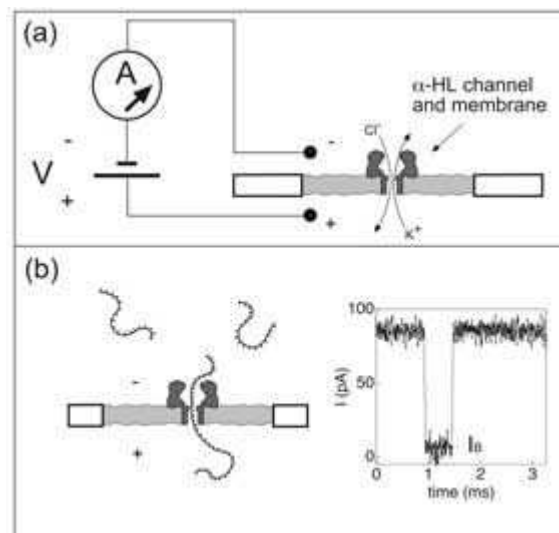


Figure 2 : Principe d'utilisation des nanopores pour séquencer le génome.

Xiaoliang Sunny Xie -Harvard University

CARS Microscopy

Le groupe de S. Xie s'intéresse essentiellement à deux thématiques. La première se concentre sur la détection de molécules individuelles pour étudier des processus enzymologiques ou liés à la conformation des protéines. L'équipe est également pionnière dans le domaine de la détection de biomolécules individuelles. Récemment, de très belles expériences intracellulaires utilisant un marquage avec des protéines fluorescentes ont permis de visualiser l'interaction entre facteurs de transcription et ADN ainsi que le processus de traduction. Ces expériences se basent sur le fait qu'un déplacement libre d'une protéine dans le cytosol est trop rapide pour donner un signal fluorescent quantifiable. En revanche, lorsque la protéine est localisée soit dans la membrane dans le cas d'une protéine membranaire nouvellement synthétisée soit sur l'ADN dans le cas d'un facteur de transcription, il est possible de la visualiser. La dynamique d'association/dissociation

d'un répresseur avec l'ADN et la dynamique du processus de traduction ont ainsi pu être observées.

Le groupe de S. Xie a été pionnier en 1999 dans la mise en œuvre de la technique CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) en microscopie, qui constitue le deuxième axe fort de ce laboratoire. Depuis cette date l'équipe occupe la place de leader mondial du domaine et développe des innovations technologiques qui démontrent que la technique CARS peut apporter des solutions en imagerie biomédicale. CARS permet d'imager des liaisons chimiques spécifiques présentes dans un échantillon sans avoir recours à aucun marquage. La méthode utilise un effet d'optique non linéaire de mélange à quatre ondes qui peut entrer en résonance avec une vibration moléculaire spécifique. Lors de notre visite nous avons pu constater que les constructeurs commerciaux Leica et Zeiss avaient placé chez S. Xie leurs prototypes de microscopes CARS. Il y a donc fort à parier que des systèmes commerciaux vont prochainement voir le jour. La microscopie CARS permettra alors de voir tout particulièrement les lipides qui donnent lieu à un bon contraste (liaisons C-H en particulier). Nous avons d'ailleurs pu observer en temps réel des images de peau de souris et apprécier la pertinence de la technique (voir figure ci-dessous).

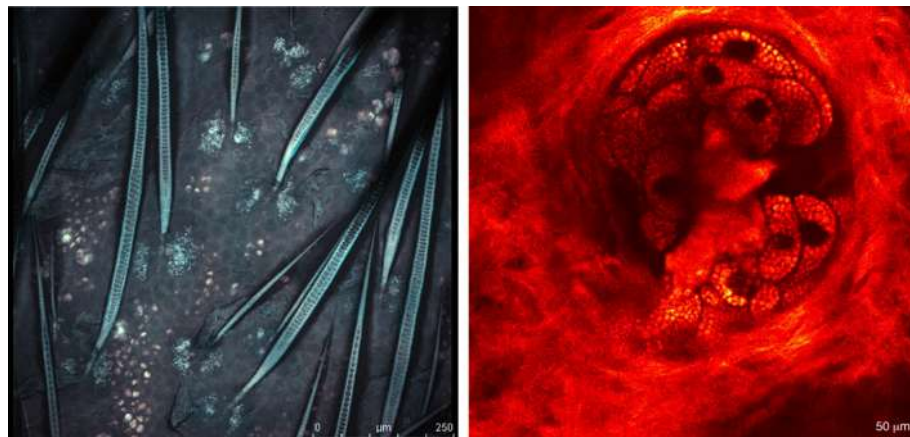


Figure 3 : Images CARS de peau de souris (sans aucun traitement). Gauche : reconstruction de la structure lipidique dans les premiers 100μm d'épaisseur de la peau. Droite : Vue rapprochée d'une glande sébacée avec un cheveux dans son centre.

Du point de vue instrumental, les systèmes CARS de S. Xie utilisent principalement des oscillateurs paramétriques optiques (OPO) qui remplacent avantageusement les plus anciens systèmes à base d'oscillateurs Saphire-Titane. Nous avons pu également découvrir que l'équipe travaille sur un système OPO qui supporte deux impulsions qui circulent dans la cavité. Un modulateur rapide électro-optique active un filtre de Liot ce qui a pour effet d'avoir les deux impulsions avec des longueurs d'ondes légèrement différentes. Cela permet de réaliser deux mesures CARS simultanées en deux points spectraux situés de part et d'autre d'une résonance moléculaire. Cette approche permet en particulier de s'affranchir du bruit non résonant CARS et simplifie la technique FM-CARS fonctionnant sur le même principe mais utilisant deux OPO.

Xiawei Zhuang -Harvard University

Advanced bioimaging and single molecule (STORM)

Le Prof. X. Zhuang a présenté les résultats récents de son groupe sur la microscopie STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). Cette technique appartient à une nouvelle classe de microscopies optiques dépassant largement la limite de diffraction classiquement atteinte avec les microscopies conventionnelles. Ces imageries peuvent être divisées en deux catégories :

- la première basée sur le RESOLF (REversible Saturable Optical Fluorescence transition), parmi lesquelles on trouve le STED (STimulate Emission Depletion). Dans ce cas un faisceau d'excitation focalisé, superposé à un second faisceau en forme de « doughnut », balayent l'échantillon. Ce second faisceau fournit une désexcitation des fluorophores par émission stimulée. Sur-saturer la désexcitation réduit le spot fluorescent à une dimension de taille sub-diffraction. Les images super-résolues sont obtenues par balayage des spots sur l'objet.
- Le second type de microscopie super-résolution inclue les techniques de STORM et PALM (Photo Activated Localization Microscopy). Ces techniques qui exploitent essentiellement le haut pouvoir résolutif atteint en imagerie de molécules individuelles sont respectivement basées sur une photoconversion ou photoactivation par illumination des molécules présentes dans un champ large d'observation. Le processus de photo conversion développé dans le laboratoire de X. Zhuang est basé sur la capacité des molécules à passer d'un état émetteur à un état noir par une excitation annexe, en alternant ainsi entre deux longueurs d'onde d'excitation, λ_{on} et λ_{off} . Les conditions expérimentales sont ajustées de manière à ne générer, à chaque cycle, qu'un faible pourcentage de molécules photo converties. Le processus étant de nature stochastique, il est possible alors de localiser individuellement les molécules activées avec une excellente résolution spatiale (de l'ordre de la dizaine de nanomètre). Chaque ensemble de molécules photo converties est ensuite éteint suite au phénomène de photo blanchiment. Le processus est ensuite réitéré afin de localiser un nouveau pool de molécules. L'image STORM est reconstruite en ajoutant les images correspondant à différents cycles de photo-activation, permettant finalement une résolution latérale de 20 nm.

Jusqu'à récemment, cette excellente résolution était limitée latéralement dans le plan de l'échantillon, la résolution axiale étant celle d'un microscope traditionnel, soit en champ large soit en illumination sous réflexion totale interne. Récemment, dans le groupe de Prof. X. Zhuang, la résolution sub-diffraction a été obtenue dans la direction axiale en implémentant dans la technique STORM une technique d'imagerie astigmatique. Une lentille cylindrique est placée

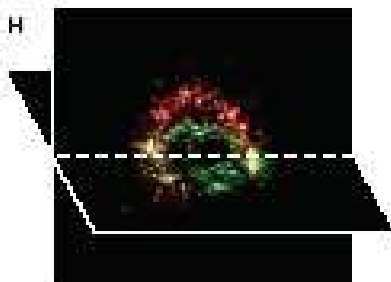


Figure 4: Image 3D STORM d'une cavité recouverte de clathrine dans une cellule. d'après Huang et al. *Science* (2008).

dans le chemin d'imagerie sur la caméra CCD afin de créer une image légèrement déformée si l'objet est hors focus. La forme allongée des images issues de molécules uniques permet de remonter à leur position axiale (forme circulaire dans le plan de focalisation, elliptique dans les directions y ou x pour des sources au dessus ou en dessous de ce plan moyen). L'ajustement des images avec des fonctions Gaussiennes 2D elliptiques a permis de reconstruire une image 3D avec une résolution de 30nm dans la direction axiale (Fig.1). L'avantage de cette technique est qu'elle n'introduit pas de temps d'imagerie supplémentaire pour accéder à l'information 3D, toute l'information étant en effet présente dans la forme de l'image de chaque molécule.

En comparaison de la technique STED, la microscopie STORM est basée sur un système optiquement simple et peu onéreux. Le STORM reste actuellement encore relativement lent : le temps d'acquisition des images (des images incluant $\sim 10^6$ molécules nécessitent 2 à 30 minutes vs quelques secondes pour la microscopie STED). Par ailleurs, les démonstrations aboutissant à une résolution optimale sont actuellement limitées aux échantillons fixes. Cependant, le développement de nouveaux couples de fluorophores laissent clairement percevoir l'énorme potentiel de la technique STORM pour analyser la colocalisation de plusieurs molécules simultanément.

Antoine Van Oijen Harvard Medical School

Single molecule in vitro biophysics

A. Van Oijen est un jeune "Assistant Professor" recruté par la Harvard Medical School en 2004 pour y monter son équipe de recherche. Il y mène des études fondamentales sur l'étude de processus biologiques élémentaires par microscopie de molécules individuelles. Il représente l'exemple parfait du jeune biophysicien brillant, que le modèle américain a séduit après des études jusqu'au niveau doctoral en Europe (Pays-Bas). Il a fait des études de physique à Leyde aux Pays-Bas sur la spectroscopie de molécules uniques avant de rejoindre le groupe de Sunney Xie (Harvard) pour un séjour postdoctoral en biophysique. Trois ans plus tard, et avec des résultats de classe internationale, il s'est vu proposer un poste de professeur assistant à la Harvard Medical School. Il y continue depuis lors des recherches sur les études des interactions enzyme-ADN au niveau de la molécule individuelle.

L'exposé qu'il nous a présenté lors de notre visite a mis en évidence l'intérêt du couplage du physicien et du biologiste pour des études des processus enzymatiques mis en jeu lors de la réplication de l'ADN. Afin d'épurer les systèmes étudiés, le groupe d'Antoine Van Oijen réalise in vitro une reconstitution minutieuse des éléments biologiques nécessaires et suffisants pour identifier les étapes élémentaires de la réplication (des systèmes eucaryotiques ou procaryotiques). Pour la réalisation de telles études, la nécessité de fortes compétences en biochimie est apparue évidente. L'utilisation de méthodes d'observation de molécules uniques permet alors d'avoir accès à l'ensemble des étapes du fonctionnement des enzymes, même les plus fugaces, et de révéler les étapes essentielles de leur bon fonctionnement. Pour obtenir une statistique et une reproductibilité importante, le groupe a développé une méthode de *peignage de l'ADN* en écoulement, ce qui a pour intérêt de ne pas devoir recourir à une manipulation molécules par molécules et ainsi obtenir un parallélisme de mesures gigantesque.

- **Department of Chemistry, Columbia University (NYC)**

Pas de visite de laboratoires lors de cette visite d'une matinée au plein Coeur de Manhattan, mais une table ronde rassemblant plusieurs professeurs de Columbia qui nous ont présentés certains aspects de leurs travaux.

Kenneth. B. Eisenthal, Department of Chemistry, Columbia University

Historiquement, le groupe de K. Eisenthal s'intéresse à la spectroscopie des phénomènes de transfert de charge dans les molécules organiques et biomolécules. L'idée d'organiser ces molécules sur des interfaces air/eau ou liquide/liquide l'a mené à orienter ses recherches vers l'investigation de ces systèmes par l'optique non linéaire et notamment la génération de seconde harmonique (SHG) ou la somme de fréquence (SFG), qui se trouvent être très sensibles aux propriétés d'une surface sur une profondeur de 10Å. Il est un des premiers à avoir appliqué de

telles techniques à l'étude de propriétés de membranes phospholipidiques dans des systèmes de type liposomes, micelles ou vésicules géantes. Un exemple de ses travaux précurseurs est la démonstration, dans les années 90, de la sensibilité de la SHG au transfert de molécules ioniques à travers des bicouches lipidiques. Son laboratoire est aujourd'hui équipé de sources infra-rouges ultra-rapides (femtosecondes) pour des applications en imagerie non-linéaire.

La récente étude que nous a présentée K. Eisenthal porte sur l'imagerie de potentiels membranaires dans les neurones :

- par SHG : la SHG de molécules sondes (de type styryl, dénommée FM4-64) est en effet sensible au potentiel local (par effet électro-optique) et constitue une sonde optique potentiellement intéressante de ce potentiel. Cette sonde est locale sur des tailles bien inférieures à ce que fournit une technique conventionnelle comme le patch clamp. La SHG est mesurée à différents endroits du neurone (spines, branches dendritiques, soma), et fournit ainsi une possibilité de cartographier la propagation de potentiels.

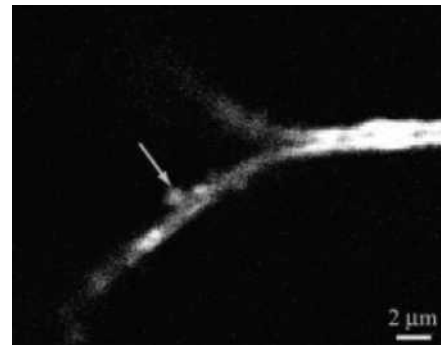
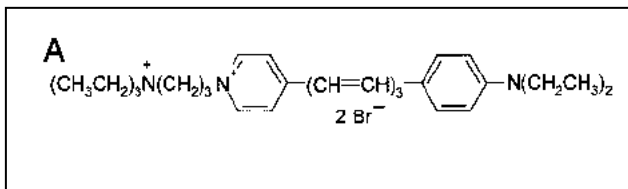


Figure 5 : Molécule FM4-64 active pour la SHG et imagerie de cette sonde dans un spine de neurone (tiré de M. Nuriya et al. PNAS 2006).

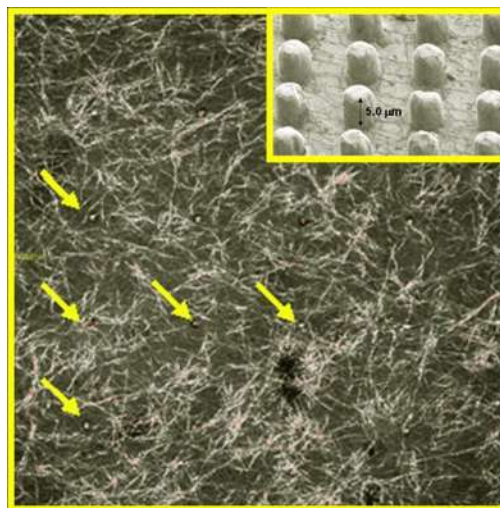
- par "patch clamp" et "décageage" : son équipe se concentre sur les petites variations de potentiels dans les contacts synaptiques (spines dendritiques) sur des tranches néo-corticales de souris. Des questions restent ouvertes sur ces structures, notamment sur leur contenu en canaux ioniques, leur rôle dans la transmission synaptique et la propagation de potentiels « retours ». Les potentiels dans ces neurones sont artificiellement générés par un "uncaging" local du glutamate sous excitation à deux photons, ce qui permet d'adresser plus précisément les zones d'étude.
- La dernière partie de sa présentation a concerné l'exaltation de signaux non-linéaires dans ces membranes : la SHG est capable de sonder des variations de potentiels de l'ordre de 20mV ce qui est trop éloigné de la résolution requise par les biologistes (1mV). Afin d'augmenter ces réponses, K. Eisenthal propose d'utiliser des particules métalliques de tailles et morphologies contrôlées, associées aux molécules non-linéaires qui verraient leur réponse exaltée à la proximité des champs forts fournis par les particules. Cette idée a déjà été testée par Aaron Lewis (U. Jerusalem) en 2000, qui a en effet prouvé le potentiel de cette approche. Dans le cas présent des particules de taille 50nmx20nm seraient utilisées (ces particules ont montré l'exaltation de signaux SFG et Raman sur des interfaces), mais aucune proposition concrète n'est apparue sur l'insertion de ces particules dans les membranes.

K. Eisenthal sera à Paris en Juillet 2008, il donnera un séminaire à l'ESPCI, il souhaite mieux connaître les acteurs français et anticiper sur de futures collaborations.

Laura Kaufmann

Laura Kaufmann est une jeune "Assistant Professor" nouvellement recrutée au Département de Chimie de Columbia. Son expertise se situe dans des systèmes physiques ou biophysiques complexes dans lesquels la dynamique est influencée par le crowding moléculaire. En biophysique, L. Kaufmann s'intéresse au domaine des films et des matrices biologiques et elle s'était tournée récemment vers la biologie pour essayer de comprendre les mécanismes de la migration cellulaire à travers la matrice extracellulaire, phénomène clef dans le développement des cancers, dans la guérison des blessures et autre processus physiologiques et physiopathologiques. La nouveauté de ses travaux réside dans le fait de combiner des mesures de rhéologie pour caractériser les propriétés physiques et visco-élastiques des matrices avec des mesures de microscopie de fluorescence, toutefois pour l'instant dans des systèmes modèles.

Figure 6 : Substrats micro-structurés pour la mesure des forces impliquées dans la migration cellulaire dans des bio-polymères.



Louis. Brus

Louis Brus est un professeur de chimie de renommée internationale à Columbia University. Son expertise est exceptionnelle à la fois dans la synthèse et l'assemblage de nanoparticules, nanocristaux ou nanotubes de différentes sortes mais aussi dans l'étude de leurs propriétés optiques et électroniques.

La rencontre avec Louis Brus dans le cadre de cette mission nanobiophotonique pourrait paraître quelque peu hors sujet, si l'on juge le peu d'implication de son équipe dans les études biophysique ou biologique. Ce serait une erreur tant il a démontré au cours de sa carrière que ses travaux peuvent être précurseurs d'applications importantes en biologie ; on rappellera simplement à titre d'exemple, qu'il est considéré comme étant le père de la synthèse et de la compréhension des propriétés optiques des nanocristaux à semiconducteurs (quantum dots), qui connaissent actuellement un essor considérable auprès des biophysiciens et des biologistes.

Au cours de son séminaire, L. Brus nous a exposé en détail l'étude théorique et expérimentale des mécanismes responsables de l'amplification locale du champ électromagnétique au voisinage de nanoparticules d'argent. De tels effets sont effectivement mal compris par manque de méthode d'investigation contrôlées et reproductibles. Nous avons ainsi été témoins de la rare maîtrise du groupe de L. Brus dans la synthèse chimique et la spectroscopie des assemblages nanométriques, qui sont les garants d'une compréhension des phénomènes physiques mis en jeu. Cette étude à

caractère de physique et physico-chimie fondamentales aura certainement des applications en imagerie biologique en champ proche, par l'utilisation des nanoparticules d'argent en tant que nano-antennes locales.

Les activités de recherche de L. Brus démontrent ainsi parfaitement comment le domaine de nanobiophotonique se construit perpétuellement sur la base d'avancées fondamentales dans de multiples disciplines incluant la chimie, la physico-chimie ou la physique.

Julio. M. Fernandez

La visite à l'université de Columbia nous a également fourni l'opportunité de rencontrer Julio M. Fernandez, invité à la table ronde à l'initiative de Kenneth Eisenthal. Julio Fernandez est Professeur au département de sciences biologiques de Columbia où il mène des recherches impressionnantes en biophysique sur le rôle des forces mécaniques dans l'induction de mécanisme réactions chimiques biologiques. Son exposé a porté sur des méthodes de microscopie à force atomique originales pour l'étude de la titine in vitro. Malgré l'intérêt intrinsèque des recherches de J. Fernandez et l'extrême qualité de ses résultats scientifiques comme l'attestent de nombreuses publications dans les meilleurs journaux (Science, PNAS, Biophys. J), son intervention était à la limite des contours de la mission nanobiophotonique en raison de l'absence de couplage à la nanophotonique.

Eric Green

Eric Green utilise des méthodes de visualisation de molécules individuelles pour étudier des interactions fondamentales entre protéines et acides nucléiques. Durant notre visite, Eric Green a essentiellement présenté ses travaux les plus récents. L'originalité de son approche réside essentiellement dans la capacité de tirer bénéfice de la sensibilité des méthodes d'observation de molécules individuelles pour quantifier des observables pertinents rendant compte des interactions moléculaires. De plus en créant une chambre d'observation sous un flux et par différents artifices, ce groupe a significativement étendu la portée de ces observations en parallélisant et en synchronisant l'observation simultanée d'un grand nombre de complexes ADN-protéines.

- **UC Davis Center for Biophotonics, University of California at Davis**

La visite au Centre pour la Biophotonique (CBST) de l'Université de Californie à Davis (<http://cbst.ucdavis.edu/>) a certainement été un moment fort de la mission de par la préparation de la rencontre par les collègues américains, mais aussi par la qualité des échanges qui ont eu lieu.

Le CBST dirigé par Dennis L Matthews est un centre tout récent financé en 2002 par la NSF sur une période de 10 ans dont la mission est de développer la connaissance et les applications dans le domaine de la biophotonique. Le centre interagit fortement avec la Medical School de UC Davis mais également avec les universités californiennes. Une mission importante du CSBT concerne également la formation par la recherche et le transfert de connaissance aux académiques ainsi qu'aux compagnies privées.



Figure 7 : Le Center for Biophotonics Sciences and Technologies de UC Davis

Les activités de recherche du centre s'organisent autour de trois grands axes que sont "Advanced Bioimaging", "Molecular & Cellular Biophotonics" et "Medical Biophotonics". Chacune de ces thématiques abritent des actions de recherches pilotées pour chacune par un chercheur confirmé. Un exposé détaillé de la recherche au CSBT nous a été présenté par Stephen Lane, Associate Director for Science and Technology. Sans rentrer dans une description exhaustive de toutes les activités, nous nous focalisons ici sur les exposés qui ont le plus marqué la délégation française.

Thomas Huser et **Sebastian Wachsman-Hogiu** mènent des recherches en microscopie CARS. L'équipe s'est distinguée en réalisant des mesures résolues dans le temps qui ont permis de séparer le signal CARS de la fluorescence mais aussi les signaux émis vers l'avant (F-CARS) et vers l'arrière (E-CARS). L'équipe mène également des travaux sur l'ultra résolution optique en utilisant une technique d'illumination structurée qui permet d'avoir accès à de très hautes fréquences spatiales dans une image. La résolution annoncée est de l'ordre de 100nm en microscopie de fluorescence ce qui doit permettre d'aborder avec pertinence des problèmes en biologie cellulaire.

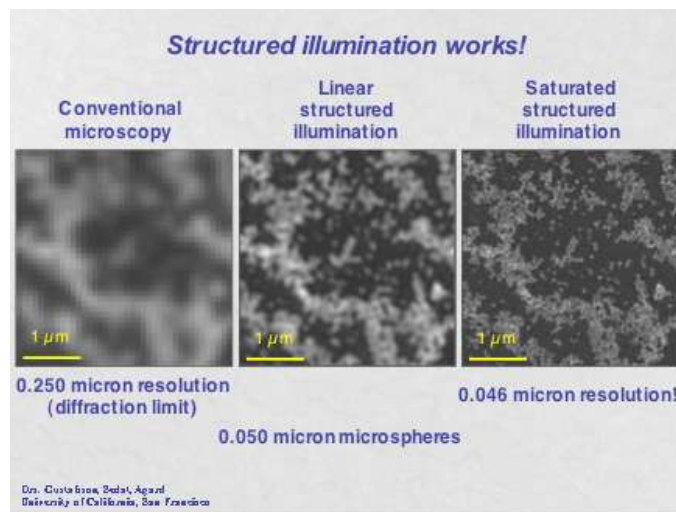


Figure 8 : Microscope OMX ultra résolvant utilisant une illumination structurée.

De plus, ce groupe effectue des études de Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence dans des nanostructures photoniques dont la dimension se situe bien en dessous de la longueur d'onde. Cela permet d'accéder à un régime de molécules individuelles à des concentrations qui sont de l'ordre du μM .

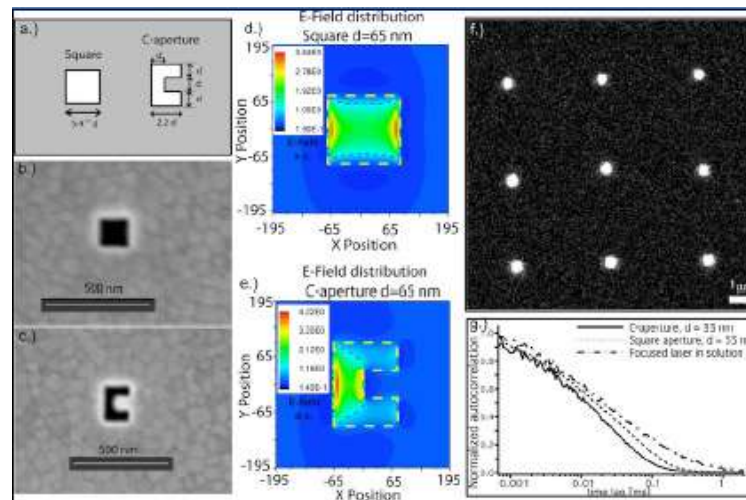


Figure 9 : Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence dans des nanostructures photoniques.

James W. Chan nous a présenté ses travaux sur le piégeage optique couplé à la spectroscopie Raman. Il s'agit de piéger une cellule ou une nanoparticule fonctionnalisée dans un faisceau laser focalisé et d'acquérir son spectre Raman. La technique peut être couplée à de la microfluidique pour réaliser du triage cellulaire. Des analyses multivariants sont mises en œuvre pour affiner les critères de tri. Les études se focalisent principalement sur la discrimination des cellules souches. La possibilité de tirer parti des exaltations SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) à partir de nanoparticules métalliques est également explorée.

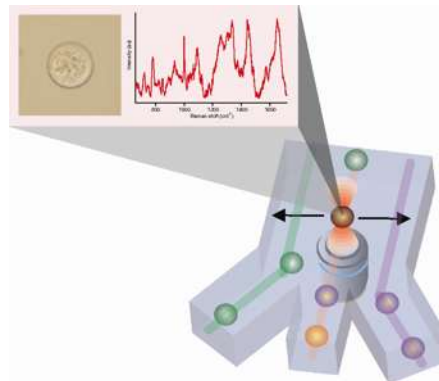


Figure 10 : Pincette optique, spectroscopie Raman et microfluidique permettent de faire du tri cellulaire.

Frank Chuang nous a présenté des résultats impressionnants obtenus avec un microscope 'Spinning Disk' montrant l'infection d'une cellule CD4 par une particule virale HIV contenant une protéine constitutive couplée à la Green Fluorescent Protein (Gag-GFP). Une compréhension

plus fine de la synapse virologique a pu être dégagée laissant entrevoir de nouvelles perspectives pour le traitement thérapeutique.

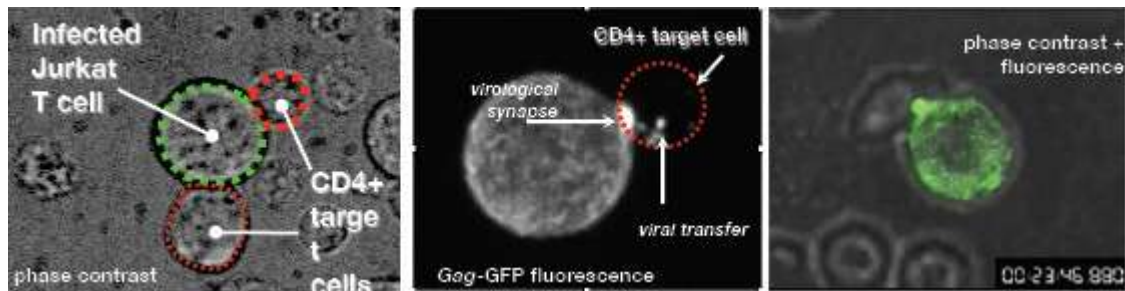


Figure 11 : Synapse virologique observée entre une cellule T infectée et une cellule cible.

Les exposés scientifiques se sont poursuivis par des discussions informelles et par la visite des laboratoires. Il est à noter que l'équipe du CBST est particulièrement motivée pour mener des actions collaboratives avec les équipes françaises.

- **University of California at Berkeley**

L'essentiel de notre visite à Berkeley s'est déroulé lors d'une table ronde rassemblant plusieurs des acteurs de la biophotonique du site. Nous avons terminé par un tour commenté du laboratoire du professeur Isacoff.

Steven Chu, Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL)

Steve Chu, Prix Nobel de Physique 1997, Directeur du LBNL, et Biophysicien de la molécule unique nous a présenté (après une discussion des sources d'erreur et de bruit dans les camera CCD) ses projets en cours sur l'étude des mécanismes d'action des complexes de transcription eucaryotes, comprenant des facteurs de transcription basal, des facteurs de transcription spécifiques et l'ARN polymérase eucaryote, qui présente à elle seule un niveau de complexité supérieur à celui de la RNAP procaryote. C'est un projet qui démarre, avec des données sur quelques facteurs de transcription (GCN4 par exemple) en fluorescence de la molécule unique, mais c'est un défi très important, étant donné la complexité du système. Il y aura sûrement autant, sinon plus, d'obstacles biochimiques que physiques à l'avancement de ce projet. Le laboratoire de Steve Chu est très bien placé pour relever ce défi. Il existe au moins un groupe français penché sur la même question avec des approches comparables.

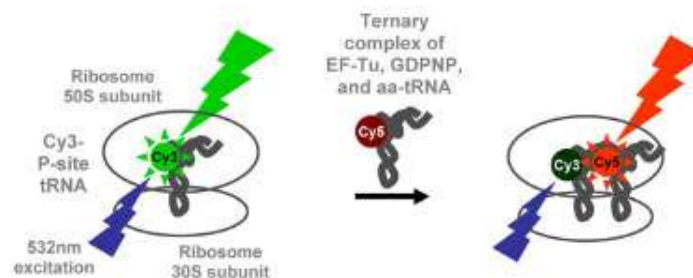


Figure 12 :

Ehud Isacoff

Le groupe de E. Isacoff s'intéresse à l'utilisation de la lumière comme outil actif du contrôle de l'activité neuronale. E. Isacoff a présenté ses résultats récents basés sur l'ingénierie et l'utilisation de récepteurs photo-activables "ionotropic glutamate" (LiGluR), un canal ionique génétiquement codé qui peut être activé ou non par excitation à différentes longueurs d'ondes, permettant ainsi l'injection optique de courants dans les cellules.

Les récepteurs "ionotropic glutamate" natifs (iGluR) sont des protéines tétramériques dont les sous-unités consistent en un domaine N-terminal extracellulaire (NTD), un domaine extracellulaire se liant au ligand (LBD), et un domaine transmembranaire (TMD) qui forme le pore. Lors de la liaison à l'agoniste glutamate, le domaine LBD subit un changement conformationnel qui induit l'ouverture du pore (Fig. 13a).

Les récepteurs photo activés sont construits en attachant au domaine LBD un groupement photo-commutable (MAG), un analogue attaché du glutamate qui peut être amené dans ses configurations trans et cis sous illumination à 500nm et 380nm respectivement (Fig 13b). Dans la configuration cis, le MAG peut lier le domaine LBD du récepteur et induire le changement conformationnel qui ouvre le canal ionique sélectif des cations, résultant en une dépolarisation de la membrane. Les trains de potentiels d'action sont adressés de manière optimale en alternant la lumière excitatrice aux deux longueurs d'onde. En les introduisant dans les neurones du système sensoriel de la larve de zebra-fish, ils ont pu montrer qu'il est possible de bloquer réversiblement la réponse « escape » à une stimulation tactile.

Jusqu'à aujourd'hui les LiGuRs sont sensibles à la lumière visible, ce groupe travaille cependant actuellement sur des systèmes excitables à deux photons.

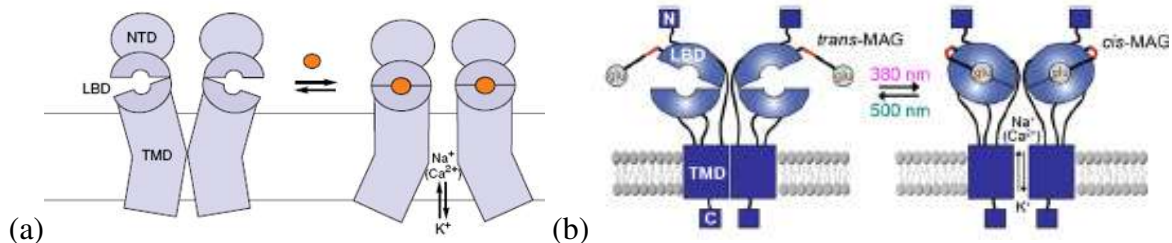


Fig. 13 (a) Schematic representation of the operating mode of iGluRs. binding of an agonist (orange) stabilize the activated (closed) conformation of the LBD and open the pore allowing flow of Na⁺, Ca²⁺ and K⁺.

(b) Schematic of the LiGuRs: the maleimide--azobezene-glutamate (MAG) is attached to a cysteine introduced in the LBD of the receptor. Adapted from Volgrast et al. Nature Chem. Biol (2006) and Szobota et al. Neuron (2007).

Jan Liphardt

Jan Liphardt fait partie des jeunes chercheurs actifs de l'Université de Berkeley, son laboratoire (une dizaine d'étudiants postdocs/PhD/undergraduates) réunit quelques thématiques aux frontières entre la chimie, la biologie et la physique. Ses projets sont actuellement centrés sur (1) l'utilisation et le contrôle de nanoparticules métalliques sondes de biomolécules isolées, (2) la microscopie super-résolution par manipulation de nano-sources, et (3) la synthèse de bactéries photo-activables.

1. Le “plasmon-ruler” composé de deux nanoparticules métalliques espacées de paires de base d’ADN contrôlées permet de mesurer des distances intermoléculaires nanométriques, échelle importante en biophysique. Il mène actuellement une collaboration avec Paul Alivisatos pour étudier la dépendance d’une résonance plasmonique en fonction de la distance entre deux nanoparticules d’or ou d’argent. Ces couples de particules ont l’avantage de présenter une émission de photoluminescence très stable, ce qui les rend intéressantes pour des applications de tracking et leur utilisation en tant qu’étalons de distances sur des durées temporelles très longues.
2. L’utilisation de nanofils de semiconducteurs a récemment mené à une application intéressante pour l’imagerie, même si J. Liphardt souligne que l’application à long-terme en milieu biologique n’est pas encore envisagée. Une collaboration avec Peidong Yang (chimie) a permis de manipuler des nanofils de niobate de potassium (KNbO₃) en les assemblant éventuellement en nanostructures 3D. Un piège optique permet de les déplacer individuellement. L’utilisation de ces nano-fils en « nano-sources » provient de la propriété non-linéaire de ces objets : par effet de guide d’onde et de propriétés intrinsèques du matériau, à leur extrémité peut en effet se produire des sommes et mélanges de fréquences dans le visible avec une accordabilité possible dépendant du pompage cependant. Ces nano-fils ont été utilisés comme sources d’illumination de nano-sphères fluorescentes.

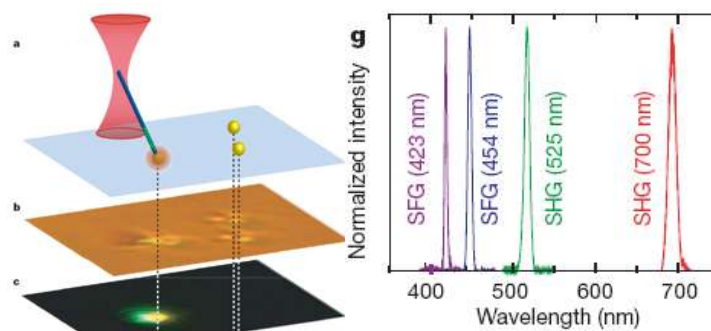


Figure 14 : (a) Nano-fil de KNbO₃ piégé optiquement. (a) imagerie champ large des nano-sphères dans l’échantillons. (c) image de fluorescence générée par illumination.

A droite : longueurs d’onde d’émission obtenues avec différentes sources d’excitation.

Ref. Yuri Nakayama et al. Nature (2007)

3. La partie biologie de synthèse de l’équipe vise à créer des structures biologiques gouvernées par la lumière, pour aboutir par exemple à des formes contrôlées de la bactérie E. coli, et étudier la conversion d’énergie lumineuse en travail mécanique.
4. Enfin une activité relevant de l’étude mécanique de biomolécules vise à appliquer des forces ou contraintes mécaniques sur des molécules uniques d’ARN ou ADN. Ces travaux sont menés en collaboration avec Carlos Bustamante (Physique)

Jay T Groves

L'objectif principal de l'équipe de recherche dirigée par Jay T Groves est d'analyser comment les interactions qui prennent place collectivement dans les membranes plasmiques de deux cellules en apposition contribue au principe d'organisation des membranes biologiques.

Cette analyse intègre l'influence de paramètres comme la cinétique d'association, la mobilité latérale des protéines de membrane ou les effets de courbure membranaire sur l'organisation des molécules membranaires et les processus de reconnaissance récepteurs-ligands. Les approches visent à élucider comment certains paramètres physico-chimiques des biomembranes déterminent la formation spatio-temporelle des plateformes de signalisations cellulaires.

Les investigations sont conduites suivant trois axes : expérimental avec l'utilisation de membranes artificielles reconstituant et mimant des systèmes biologiques, instrumental avec la mise en œuvre de techniques sophistiquées de visualisation et de mesures d'observables pertinents, et théorique par le calcul et la modélisation.

▪ Stanford University (CA)

Stephen Block

Les travaux de Steve Block concernent les mécanismes moléculaires des moteurs biologiques ainsi que le repliement et la stabilité des protéines et acides nucléiques. Il est particulièrement connu pour ses études sur l'ARN polymérase, mais il a travaillé aussi sur la kinésine et sur le repliement des aptamères d'ARN. Afin d'étudier ces mécanismes, en particulier dans le cas des moteurs qui ne restent pas synchronisés dans des mesures d'ensemble, S. Block a mis au point des techniques d'étude des molécules uniques. Son système de « Passive Force Clamp » basé sur une double pince optique permet de diminuer les sources de bruit, de sorte que des mesures d'une précision d'un Angstrom de changement de distance soient possibles à une vitesse compatible avec les déplacements des moteurs biologiques. Ainsi, le pas d'une paire de bases pour le mouvement de l'ARN polymérase a pu être mis en évidence. Plusieurs autres détails mécanistiques concernant les pauses, l'ouverture, l'initiation abortive, la terminaison etc ont aussi pu être décrits.

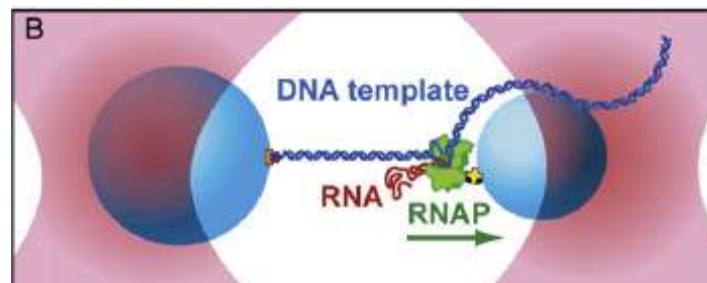


Figure 15 :

La précision de ses mesures tient aussi au dispositif expérimental (manipulations dans une enceinte d'hélium pour diminuer les perturbations de l'indice de réfraction, salle blanche, élimination de toute vibration, température ultra stable, etc). Lors de la visite de la délégation, il nous a patiemment expliqué les détails techniques de son installation et nous a fait une

démonstration d'utilisation. Dernièrement, en particulier dans le repliement des aptamères d'ARN, il a su coupler les pinces optiques aux mesures de fluorescence de la molécule unique.

William E. Moerner

Le groupe de W. Moerner s'intéresse particulièrement à l'imagerie et à l'investigation de biomolécules isolées, en collaborant avec des biologistes de l'Université de Stanford. Avec un groupe de 10 à 15 étudiants, il développe essentiellement quatre thématiques:

1. Etude de nouveaux chromophores pour l'imagerie de molécules individuelles : des molécules individuelles développées initialement pour l'optique non-linéaire sont utilisées comme sondes locales d'environnements. Les travaux récents se sont concentrés sur des applications sur la bactérie *Caulobacter crescentus* (bactérie qui a une division asymétrique – l'une à un flagelle, pas l'autre), et plus particulièrement sur la protéine MreB (protéine impliquée dans le cytosquelette). Ces protéines MreB sont suivies par SPT (single particle tracking) pour observer les processus de polymérisation des filaments d'actine et leurs directions dans la bactérie (on les trouve perpendiculaire à la direction du grand axe de la bactérie).
2. Etude de comportements conformationnels de biomolécules: des études récentes ont montré la possibilité de sonder la conformation de la protéine Chaperonin GroEL, issue de bactéries, qui assiste le repliement de protéines au cours de leur formation. Cette étude conformationnelle a été réalisée en utilisant une sonde moléculaire médiatrice du pH local (Nile Red maléimide), greffée sur un mutant de GroEL. La liaison de toutes les composantes du complexe (substrat et nucléotides compris) a montré des modifications de la polarité locale en présence ou non d'ATP, signature du rôle de chacune des composantes du complexe. Ces études sont menées aujourd'hui à l'échelle de la molécule unique mais des difficultés apparaissent pour obtenir un vrai contraste ratiométrique rapporteur d'un changement faible d'environnement local.
3. Nanophotonique : l'équipe s'intéresse essentiellement aux structures 'Bow Tie' (deux triangles en métal qui se font face). L'espace entre les triangles peut être modifié de quelques dizaines à quelques centaines de nm. On cherche ainsi à avoir des exaltations électromagnétiques aux bouts des pointes. Pour observer cette exaltation, on utilise la fluorescence à deux photons de l'or directement. On observe alors que le signal provient essentiellement de la pointe des pyramides (lieu de l'exaltation maximale). On peut aussi vérifier que c'est la zone où on obtient le plus de polymérisation de résine (lorsque l'on recouvre la structure d'un film de résine). Ces structures sont aujourd'hui utilisées pour fournir une exaltation locale du signal SERS pour les molécules de pmercaptoaniline. La difficulté d'obtenir des structures reproductibles avec les outils locaux de nanolithographie, avec une résolution acceptable, a mené cette équipe à travailler sur des Focused Ion Beam plus résolus en Europe qui fournissent également la possibilité de graver un Bow Tie au bout d'une pointe métallique.
4. ABEL trap – Anti Brownian Electrokinetic trap : on mesure la position de la molécule par fluorescence (détection de molécule individuelle), ensuite on applique un potentiel pour ramener la molécule à la position désirée. Si cette opération est effectuée assez rapidement, le mouvement Brownien peut être annulé. Ce piège utilise la force électrophorétique et/ou électroosmotique. Le piège marche en 2D, le confinement suivant z est assuré par la fluidique (canal étroit dans cette dimension). Ce piège a été utilisé pour bloquer la diffusion Brownienne de l'ADN en solution, on peut alors observer les modes de vibration propre de l'ADN (la diffusion étant bloquée). Une thèse démarre aujourd'hui sur la manipulation de complexes de biomolécules et protéines individuelles.

- **Laboratory for Fluorescence Dynamics (LFD), University of California at Irvine**

Les travaux du LFD ont été présentés par Enrico Gratton et par ses collaborateurs, Michelle Digman et Christian Hellriegel.

Enrico Gratton

L'équipe d'Enrico Gratton développe des approches originales pour l'imagerie de fluorescence (imagerie des temps de fluorescence - FLIM), imagerie de corrélation, suivi de particules). Le laboratoire développe également des logiciels de traitement de données d'imagerie qui sont proposés en accès libre.

Enrico Gratton a présenté une nouvelle approche, appelée "phasor" permettant de contourner les difficultés rencontrées lors des ajustements des déclin de fluorescence par des bi- ou multi-exponentielles, particulièrement importantes lors de mesures intracellulaires où peu de photons sont disponibles par pixel de l'image. Cette approche utilise la partie réelle et la partie imaginaire de la transformée de Fourier du déclin de fluorescence représentées sur un graphe polaire 2D. Un point sur ce graphe correspond au déclin caractéristique de fluorescence d'un fluorophore spécifique et permet de l'identifier. On peut également démontrer qu'en présence de deux fluorophores sur un pixel de l'image, le point correspondant sur ce graphe polaire, se trouve sur une ligne droite joignant les deux points représentant le déclin de chaque fluorophore individuel. En fonction de la position sur cette ligne droite, il est possible de déterminer de façon quantitative la contribution de chaque fluorophore à chaque pixel de l'image sans recourir à de procédures d'ajustement longues. De même, ce graphe polaire permet de déterminer l'efficacité de transfert d'énergie résonant (FRET) entre un donneur et un accepteur. Dans ce cas, l'approche classique est basée sur la détermination du temps de vie du donneur qui diminue à cause du transfert d'énergie mais devient complexe lorsque le déclin du donneur n'est pas mono-exponentiel.

L'approche « phasor » permet de calculer la trajectoire sur le graphe polaire correspondant à un transfert d'efficacité croissante et ainsi d'associer un point du graphe à une valeur d'efficacité FRET. On obtient de cette façon à partir de l'image expérimentale une image de l'efficacité de FRET sans ajustements des déclin de fluorescence.

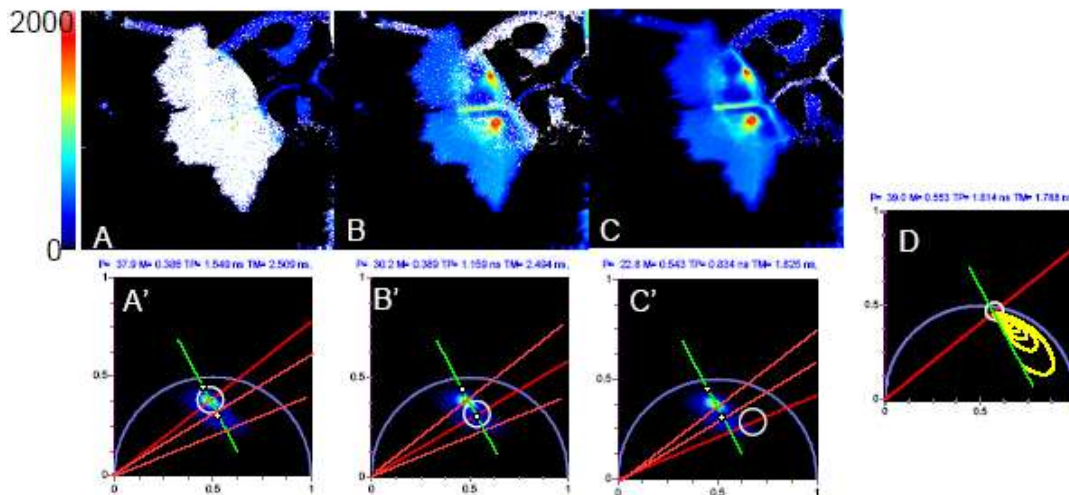


Figure 16 : Exemple d'un traitement d'une image FLIM à l'aide de l'approche Phasor. Temps de vie du donneur et de l'accepteur (A) et (A'). Autofluorescence (B) et (B') (l'échelle a été changée pour l'autofluorescence). Sélection d'une région (C') le long de la trajectoire de 'quenching' du donneur (D) indiquant le FRET (image C à la jonction entre cellule – en haut à droite)

Différentes autres applications basées sur des mesures de temps de vie sont envisageables dont la mesure de concentrations ioniques et de pH et la visualisation de réactions biochimiques impliquant des changements de temps de vie. Plusieurs collaborations sont en cours à cet effet dont une avec une équipe française (Maïté Coppey – Institut Jacques Monod).

Un chip pour l'acquisition directe dans le domaine des fréquences des données nécessaires pour l'approche "phasor" a également été développé. Il permet de s'affranchir d'une détection de type "time-correlated single-photon counting" et est commercialisé par une spin-off du Laboratoire (ISS - Illinois).

Michelle Digman

Michelle Digman a présenté la technique RICS (Raster Image Correlation Spectroscopy) qui permet d'obtenir une information sur la diffusion spatio-temporelle. Les biologistes cellulaires se basent essentiellement sur une approche réductionniste afin d'expliquer les activités de la cellule en terme physico-chimique. Pour cela, il est nécessaire de quantifier les concentrations moléculaires, et les états d'agrégation/association dans les cellules vivantes au cours de leur activité physiologique.

Michelle Digman nous a présenté une nouvelle approche basée sur l'analyse des fluctuations de fluorescence pour cartographier les interactions moléculaires dans chaque pixel d'une image. L'originalité de cette méthode résulte dans l'information quantitative à la fois du nombre et de l'état d'agrégation/association des molécules. Elle est représentée pixel par pixel donnant ainsi une vue d'ensemble de l'organisation moléculaire à l'échelle de la cellule. Cette méthode est rapide et peut être mise en œuvre pour suivre la réorganisation des récepteurs en fonction du temps au cours des processus de signalisation,

Christian Hellriegel

Christian Hellriegel nous a présenté une technique développée pour le suivi de particules individuelles en 3D à l'aide d'un microscope à balayage. Obtenir un suivi en 3D est un des principaux enjeux dans le domaine de la détection de molécules uniques. Des scans successifs d'une série complète d'images 2D ne permettent pas une résolution suffisante. Récemment, plusieurs approches ont été proposées visant à obtenir une information en z à partir du pattern d'émission en dehors du plan focal. L'approche retenue au LFD est de réajuster la focalisation de l'objectif en fonction de la trajectoire de la particule. Un balayage orbital au dessus et en dessous de la localisation de la particule permet de déduire sa localisation en x, y et z avec une précision de 1 à 30 nm selon le nombre de photons. Cette technique a été démontrée pour le suivi de nanoparticules d'or de 40 nm et peut être étendue au suivi de plusieurs particules ainsi qu'à des mesures simultanées de spectre, de polarisation ou de temps de vie. Le principe de cette technique est similaire à celui utilisé par l'équipe de Bordeaux (L. Cognet, B. Lounis) pour le suivi 2D de nanoparticules métalliques par détection photothermique.

Par ailleurs, des résultats récents sur une émission large bande observée lorsque des nanoparticules d'or de 5 nm se trouvent à proximité immédiate de fibres de collagène ont été présentés. Le mouvement aléatoire de la nanoparticule d'or permet ainsi d'explorer les propriétés de son environnement. L'origine de cette émission n'est pas clairement identifiée pour le moment.

Eric.O.Potma

Eric Olaf Potma est un ancien post-doctorant de S. Xie (Harvard-Boston) qui vient d'obtenir un poste de "Assistant Professor" à UC Irvine. Son groupe est localisé dans le même bâtiment que

celui d' E. Gratton. Le groupe de E. Potma dispose de salles d'optiques abritant un microscope CARS présentant certaines originalités par rapport aux systèmes de S. Xie. Tout d'abord le système permet de réaliser de la microscopie CARS avec une détection hétérodyne ce qui permet de s'affranchir du signal CARS non résonant. Pour cela le signal de l'oscillateur local est généré dans une fibre à cristal photonique. Par ailleurs E. Potma travaille sur le façonnage du front d'onde pour contrôler la génération des signaux CARS. La construction du signal CARS dépendant fortement des phases relatives des différents dipôles non linéaires activés, le contrôle des phases relatives permet de générer des images CARS ayant comme particularité de faire ressortir les interfaces.

III- Analyses et conclusions thématiques

- *Les systèmes étudiés*

- **Au niveau moléculaire**

Partout où nous avons été accueillis, nos hôtes ont surtout abordé des questions de méthodologie (et nous aussi). Ceci était vrai aussi pour un certain nombre d'invités dans ces discussions. Ceci reflète la dualité de la biophotonique : le développement de nouvelles approches et leur application astucieuse à des problèmes de biologie spécifiques. Ainsi quelques applications ont aussi été présentées par nos collègues américains (et nous-mêmes). Parmi les systèmes d'étude les plus souvent abordés on constate l'importance des études sur les acides nucléiques, à la fois pour des applications à visée de compréhension fondamentale que des applications commerciales (comme le séquençage rapide et moins onéreux des génomes). En effet, les méthodes de molécule unique, spécifiquement photonique comme le smFRET ou autre (pincés optiques, pincés magnétiques, etc) sont particulièrement bien adaptées à l'étude de moteurs processifs sur un substrat long et linéaire. Ainsi, les processus de transcription, traduction, réparation, etc des acides nucléiques tiennent une place importante dans les thèmes de recherche développés. Néanmoins, nous avons aussi entendu des applications nanobiophotoniques sur des systèmes de cellules nerveuses, des organismes entiers avec des applications cliniques, ainsi que des études fondamentales sur des moteurs comme l'actine, la kinésine, ou encore les complexes d'adhésion cellulaire.

- **Au niveau cellulaire**

Comme nous l'avons mentionné précédemment la biologie cellulaire se base essentiellement sur une approche réductionniste qui vise à expliquer les activités de la cellule en termes physico-chimiques. En ce sens, la connexion entre le nano-monde et la biologie cellulaire moderne est forte. Elle est perceptible dans la plupart des centres visités où une réelle intégration interdisciplinaire est soutenue. Cette recherche translationnelle est promue de différentes façons :

- Création d'instituts pluridisciplinaires regroupant au sein d'un même édifice les meilleures équipes dans chacun des domaines (i.e. QB3, Berkeley)
- Adossement effectif d'un institut d'engineering et d'instrumentation à un campus biomédical (i.e. Center for Biophotonics, UC Davis)
- Collaborations classiques entre départements et essaimage (i.e. Chemistry department, Harvard, avec Harvard Medical School)

Par ailleurs, nous avons pu remarquer une implication significative de la chimie et de l'engineering pour développer des projets d'interface avec les biologistes. Cette culture résulte de

notre point de vue d'une association ancienne et non complexée de la recherche en engineering au sein même des grands établissements de recherche.

- **Au niveau tissulaire**

Les échelles nano qui étaient au centre de nos visites ne se prêtent pas facilement à l'observation des tissus, à part peut-être ceux de la rétine dont nous avons parlé dans le cadre de la visite de Harvard. La raison en est que les tissus biologiques, à la différence des cellules en culture par exemple, diffusent fortement la lumière et qu'il est difficile de mener une observation à haute résolution (quelques centaines de nanomètres) dans l'épaisseur des tissus. L'œil reste une exception.

L'autre centre de recherche à aborder l'observation des tissus est le UC Davis Center for Biophotonics qui possède une structure très particulière, assez différente de ce que l'on peut trouver en France : un hôpital de recherche associé à une recherche translationnelle (ici passage de la recherche à l'hôpital) en photonique.

La recherche sur les tissus concerne en particulier quelques aspects de diagnostics pour interventions chirurgicales dites '*minimally invasive*', ici l'endoscopie, où la très grande miniaturisation est de rigueur.

Parmi les approches qui nous ont été signalées notons :

- un système d'éclairage très performant pour ces opérations souvent délicates (et qui a conduit à la création d'une société)
- une utilisation de la spectroscopie Raman pour le diagnostic rétinien.
- un microscope miniature sur la base d'une idée du groupe de G. Kino à Stanford (microscope à deux objectifs à champ croisés, très peu ouverts)
- un système combiné piège optique + spectromètre Raman pour les maladies cardiovasculaires. Il s'agit ici de piéger des particules lipoprotéiniques et d'en faire la spectroscopie. La présence de ces particules est liée au régime alimentaire des patients.
- une activité très instrumentale de microscopie à éclairage structuré, ou d'OCT mais le groupe ne semble pas porteur sur ces activités.

- ***Les outils***

- **L'imagerie**

Le développement de nouvelles techniques d'imagerie appliquées à la biologie est apparu comme un thème central dans lequel des stratégies innovantes continuent de se développer. Parmi les méthodes utilisées nous avons pu retrouver les techniques traditionnelles de fluorescence, d'optique non-linéaire, mais également des stratégies nouvelles comme l'ultra-résolution, et la manipulation de données dédiée à l'imagerie fonctionnelle. Il apparaît notamment que les chercheurs américains sont efficaces pour mettre en place de nouvelles stratégies d'imagerie innovantes. Ce constat s'accompagne de l'observation que ces chercheurs bénéficient d'un tissu collaboratif efficace entre physiciens, biologistes, cliniciens et éventuellement industriel.

Différents axes marquants émergent de la thématique imagerie :

- ***Imagerie non-linéaire*** :

Ce domaine évolue aujourd'hui davantage vers les imageries sans sondes chimiques, avec notamment des avancées incontestables sur le CARS (Sunny Xie , Eric Potma) pour lequel le lien

vers le diagnostic clinique est clairement recherché, en collaboration étroite avec les industriels microscopistes et laseristes. Le couplage du CARS avec d'autres techniques comme l'excitation deux photons est souvent mise en place comme sonde supplémentaire.

L'imagerie SHG, reposant sur l'utilisation de sondes chimiques, est davantage développée dans un contexte d'imagerie membranaire : ces études sont dominées par quelques laboratoires mais relèvent aujourd'hui plus d'un approfondissement (les premières démonstrations d'imagerie de potentiel membranaire dans les neurones par SHG remontent en effet à 5 ans déjà). Il est clair aujourd'hui que cette imagerie présente certaines limites que l'on a pu remarquer dans le besoin par exemple d'exalter les signaux observés.

Enfin il apparaît que l'excitation non-linéaire est maintenant appliquée de façon routinière comme outil pour le décageage sur des canaux ioniques de membranes de neurones par exemple.

- Imagerie super-résolue :

Les recherches actuelles sont très actives et compétitives pour dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction en microscopie. Les solutions proposées en microscopie de fluorescence, au niveau international, sont basées sur des processus sélectifs d'interactions lumière matière : émission stimulée ("STED" : Stimulated Emission Depletion), saturation ("SSIM" : Saturated Structured Illumination Microscopy) ou photo-activation ("PALM" : Photoactivated Localization Microscopy et "STORM" : Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). Cette dernière technique est née dans le groupe de Betzig (Janelia Farm), suivi par des développements plus récents chez X Zhuang (Harvard). La haute résolution obtenue (20-30 nm en latéral et 50–60 nm en axial) par photo-activation est sans doute le fait le plus marquant de ces dernières années en imagerie de fluorescence, preuve en est que de nombreux laboratoires visités au cours de ce séjour démarrent aujourd'hui des projets autour de ce type d'imagerie. L'inconvénient majeur de cette technique reste le temps d'acquisition, actuellement d'une minute par image (bien que la réduction à quelques dizaines de ms soit prétendument accessible). Cette limitation repose sur la nécessité d'une reconstruction stochastique pour rétablir la position des molécules. L'application de cette technique pour adresser des problèmes dynamiques en biologie n'est donc pas immédiate.

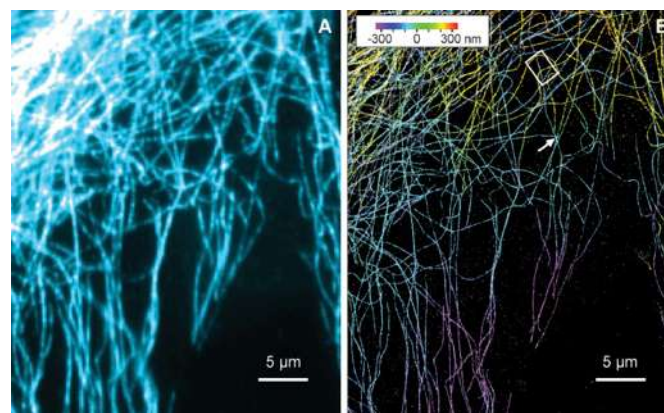


Figure 17 : Imagerie de microtubules marquées par des fluorophores dans une cellule : (A) par imagerie champ large conventionnelle, (B) par STORM 3D, le code de couleur caractérisant la profondeur dans l'échantillon. Extrait de B. Huang et al. Science Express Reports 4, 1153529 (2008).

L'imagerie par illumination structurée a également un avenir industriel avec l'OMX (Optical Microscope eXperimental, co-développé avec un partenaire industriel Applied Precision (API)), dont les performances nous ont été décrites au Biophotonic Center de Davis par J Chan (Livermore lab).

Enfin la visite de UC Irvine dans le groupe de E Gratton nous a montré que les outils de résolution temporelle apportés par la FCS, le FLIM et le FRET, pouvaient avantageusement être utilisés comme « imagerie intelligente » intégrant des contrastes qui ne seraient plus liés uniquement à une intensité de fluorescence mais à une statistique sur le bruit et sur le temps des photons émis. Ces techniques qui sont avant tout des développements instrumentaux basés sur des concepts assez anciens, ont mené à des propositions intéressantes, comme celle de pouvoir par exemple imager rapidement le temps de diffusion latérale de protéines membranaires afin de discriminer avec efficacité des composantes localisées immobiles de familles plus mobiles. Avec ces prouesses, il devient possible de réaliser une biologie plus quantitative. La pertinence de telles approches reste encore à un stade émergent en biologie.

○ La photo-activation

Les récepteurs ionotropique glutamate présentés par E. Isacoff (Berkeley, University) appartiennent à une classe extrêmement prometteuse d'outils optiques qui permettent un contrôle non invasif de l'activité neuronale. Les avantages par rapport à l'électrophysiologie sont liés à la nature optique de la stimulation : possibilité de stimuler plus précisément plus de processus, ajuster le volume d'excitation pour mimer différentes situations, adresser des échelles allant de la synapse unique à l'excitation de zones plus larges comprenant un neurone entier ou un groupe de neurones.

Une approche similaire aux récepteurs ionotropique glutamate consiste à exprimer dans les neurones des canaux ioniques photo-sensibles. Parmi ceux ci se trouvent le canal de cations de l'algue verte unicellulaire channelrhodopsin-2 ou la pompe chlore halorhodopsin d'une archaebactérie.

Une technique alternative du contrôle optique des circuits neuronaux est la technique de décaage. Dans ce cas une stimulation des synapses ou d'autres récepteurs transmetteurs est obtenue par photoactivation de neurotransmetteurs cagés. Des molécules actives biologiques sont utilisables (glutamate, calcium ATP etc.) et activables par un groupe bloquant photosensible, la « cage ». Après absorption de la lumière le lien covalent liant la cage aux molécules actives est brisé et la molécule de signalisation est libérée. Le processus de signalisation peut donc être contrôlé précisément par un contrôle spatio-temporel de la lumière d'excitation. Traditionnellement, le décaage a été réalisé sous lumière UV, l'implémentation récente d'excitation à deux photons a permis d'augmenter la sélectivité spatiale du décaage, il est donc possible de mimer par exemple l'excitation d'une seule spine dendritique. Le Prof. Eisenthal (Columbia University) a mentionné des expériences réalisées en collaboration avec R. Yuste (Columbia University), basé sur un décaage à deux photons de glutamate sur des épines dendritiques de neurones pyramidaux néocorticaux de souris (Fig.1). Toutes ces méthodes ont les avantages et les inconvénients d'une application très spécifique. En général elles sont représentatives d'une tendance grandissante en biophotonique où la lumière est utilisée pour former des images tout en délivrant des schémas de stimulations avec une caractéristique spatio-temporelle précise.

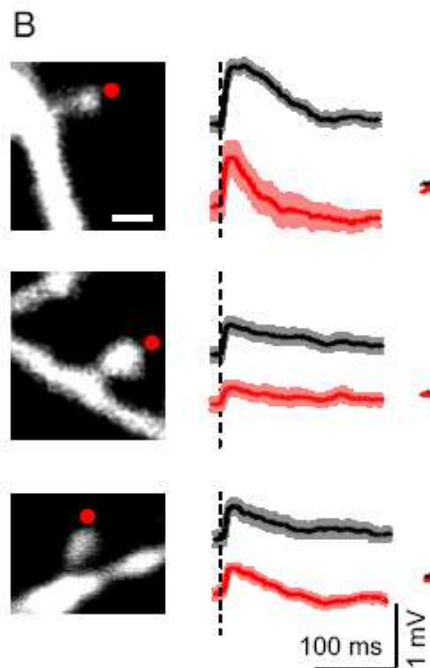


Figure 18: Representative spine uncaging experiments. (Left) Red dots indicate site of uncaging. (Right) Uncaging potentials under control conditions (black traces) and in TTX (red traces) in current clamp configuration. (Scale bar, 1 μ m.); Adapted from Araya et al. PNAS (2007)

○ Manipulation et détection de particules individuelles

Les méthodes basées sur la manipulation et la détection de molécules uniques occupent une place importante dans le paysage franco-américain de la nanobiophotonique. Cet état de fait s'est encore manifesté par la forte proportion d'experts français et de groupes visités utilisant ces méthodes lors de la présente mission.

Cette place importante provient de plusieurs facteurs distincts. Un facteur historique en premier lieu. Les premières détections de molécules fluorescentes uniques ont en effet été réalisées quasi-simultanément à Bordeaux (M. Orrit) et à San Jose (W.E. Moerner) au tout début des années 90. Le domaine est tout d'abord venu à maturité dans la communauté de la physique au cours des années 90 avant d'être appliqué progressivement à des problématiques biologiques. Les réalisations les plus spectaculaires ont été faites dans des systèmes *in vitro*, jusqu'à la fin des années 90, avant que des applications décisives aient lieu en milieu cellulaire au début des années 2000. Principalement l'apanage des physiciens, puis des biophysiciens et physico-chimistes, un nombre croissant de biologistes commencent à utiliser de telles méthodes.

Comment les méthodes basées sur la détection et la manipulation de molécules uniques ont-elles pu commencer à s'imposer en nanobiologie ? Après le séquençage du génome, la compréhension de la structure intime des protéines, de leurs fonctions et du réseau de leurs interactions est devenu l'un des plus grands défis de la recherche en biologie ; on parle alors de protéomique et de génomique fonctionnelle. Ces problématiques utilisaient principalement les approches de biochimie et de biologie moléculaire. Elles permettent d'obtenir la valeur moyenne d'un grand nombre d'objets observés, mais souffrent du manque d'informations sur l'influence de leur environnement nanoscopique. Les protéines évoluent dans un monde nanométrique et compartimentalisé. En effet, les protéines individuelles font souvent partie de complexes macromoléculaires de un à plusieurs dizaines de nanomètres et sont composés de dizaines de molécules. Ces complexes sont de surcroît, localisés dans des compartiments cellulaires spécifiques, souvent très restreints, et qui sont le lieu d'interactions privilégiées entre molécules, jouant parfois le rôle de nano-réacteurs chimiques. Comprendre l'organisation et la fonction de

ces compartiments et des protéines qui évoluent en leurs seins est actuellement l'un des enjeux majeurs de la biologie. L'avènement de l'observation et de la manipulation d'objets nanométriques individuels permet d'apporter de telles réponses. Ce domaine est promis à jouer un rôle décisif dans la compréhension de la biologie à l'échelle nanométrique. Il permet en effet d'en étudier les *acteurs* dans leur *environnement sans avoir recours à une synchronisation temporelle, ni à une uniformisation de l'environnement spatial des évènements observés*.

L'étude de nano-objets dans des conditions complexes est en effet souvent obscurcie par toutes sortes de désordres statiques et dynamiques. Or, depuis qu'il est possible de fabriquer, d'étudier, de caractériser ou de manipuler des objets nanométriques individuels, (comme de petites molécules, polymères, nanocristaux semi-conducteurs ou métalliques, centres colorés, etc...), on peut s'affranchir de tels désordres. La panoplie des techniques employées s'étend des microscopies à sonde locale à la spectroscopie optique en passant par la nanomanipulation mécanique ou optique. On est bien là au cœur même de la nanobiophotonique.

L'isolation d'un seul nano-objet permet ainsi de se débarrasser de toute inhomogénéité, et de mettre en évidence des fluctuations temporelles impossibles à synchroniser dans un organisme vivant et donc masquées dans les mesures d'ensemble. La mesure de plusieurs paramètres sur un même objet, puis répétée sur un grand nombre d'objets permet d'effectuer une statistique et de révéler par la même des sous-populations même minoritaires. De nombreux exemples récents ont montré que les études de telles sous-populations se sont révélées primordiales en milieu biologique. De surcroît, par rapport aux méthodes spectroscopiques usuelles, seule la spectroscopie d'objets uniques autorise la recherche de liens entre ces différentes distributions.

Le dernier avantage que nous citerons concerne la possibilité de mesurer avec des précisions nanométriques la position spatiale d'une molécule individuelle. Poussées à ces limites, les précisions atteignent l'ångström *in vitro* (Stanford) et donnent accès à l'étude de déplacements intermoléculaires jamais atteints.

Les méthodes de molécules uniques sont maintenant en pleine maturité, ce qui permet une explosion des applications *in vitro* et *in vivo*, mais aussi le raffinement des techniques employées. On peut identifier deux directions de recherche particulièrement actives à l'heure actuelle, dans lesquelles les groupes américains et français tiennent une très bonne place internationale : en premier lieu, le développement de méthodes dites super-résolutives basées sur la photo-activation de molécules individuelles dans échantillons fixés, qui permettent une résolution optique jusqu'alors jamais atteinte, proche de la taille des molécules biologiques elles même. Il est flagrant de relater qu'en très peu de temps, (à peine trois ans), de très nombreux groupes de recherche (de la physique à la biologie) annoncent utiliser ces méthodes de pointe. Les groupes américains (Harvard and NIH) sont à l'heure actuelle particulièrement innovants dans ce domaine. En deuxième lieu, on citera les méthodes de suivi à deux ou trois dimensions de molécules individuelles dans des cellules vivantes utilisant différents types d'objets nanométriques. Le but étant d'obtenir des trajectoires d'objets biologiques nanométriques pendant des temps arbitrairement long et avec des précisions nanométriques afin d'obtenir le parcours complet d'un biomolécule dans son environnement cellulaire. On notera que sur ces sujets, la nanobiophotonique française (Bordeaux, ENS, Marseille, Polytechnique, ...) et américaine (Harvard, UC Irvine, Stanford, UCLA...) sont particulièrement innovantes.

○ **Le développement de nouvelles sondes biologiques**

En dehors du développement de sondes biologiques plus brillantes et plus photostables pour la microscopie de fluorescence, l'enjeu dans ce domaine est d'inventer des sondes sensibles à leur

environnement, à des paramètres comme le pH et les concentrations ioniques, ou des sondes commandables, avec possibilité d'activation et désactivation à volonté.

Parmi les nouvelles sondes développées dans les laboratoires visités, la plus spectaculaire est le « photoswitch » découvert par l'équipe de Xiaowei Zhuang, constitué d'un couple de fluorophores (par ex. Cy3-Cy5) dont l'un sert d'activateur et l'autre d'émetteur. Cette famille de sondes (plusieurs couleurs d'émission ont été démontrées), pouvant être activées avec une longueur d'onde et observées par excitation avec une longueur d'onde différente, a permis la mise au point d'une approche de microscopie optique de ultra-haute résolution, le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). En France, plusieurs équipes commencent à s'intéresser à cette approche d'observation optique en dessous de la limite imposée par la diffraction avec une première démonstration dans le cadre de l'imagerie de nanotubes de carbone (Rice University, Bordeaux). Au niveau européen, une technique concurrente a été développée par Stefan Hell, Göttingen, Allemagne (STED, Stimulated Emission Depletion Microscopy) et a très récemment permis le suivi de vésicules synaptiques à cadence vidéo.

On peut également mentionner le développement de protéines fluorescentes par mutagenèse dirigée à partir de phytochromes tronqués pour le suivi de biomolécules individuelles par création de protéines fusion (T. Huser, CBST, Sacramento). Les propriétés de fluorescence de ces sondes peuvent être modulées par l'addition de différents chromophores. Le pionnier mondial dans le domaine des protéines fluorescentes est Roger Tsien, University of California, San Diego.

La durée limitée du voyage ainsi que la richesse des recherches menées en biophotonique n'ont pas permis de visiter les laboratoires pionniers dans le développement de nouvelles sondes biologiques à partir de boîtes quantiques colloïdales (quantum dots, QDs) : Mounqi Bawendi, MIT, Shimon Weiss, UCLA, Paul Alivisatos, UC Berkeley, Hedi Mattoussi, Naval Research Lab, Dans le domaine du développement de sondes à base de nanoparticules, la recherche française se positionne bien avec, entre autres, l'ESPCI (amélioration de la cristallinité des QDs, forte diminution du clignotement), l'ENS (suivi de biomolécules individuelles avec des QDs), l'Université de Bordeaux (détection photothermique de nanoparticules métalliques de quelques nm) et l'Ecole Polytechnique (nanoparticules dopées par des terres rares).

IV- Conclusion

Les contenus

Les présentations des chercheurs Français couvraient le plus souvent des champs qui allaient de la méthodologie expérimentale aux problèmes biologiques spécifiques.

Même s'il paraît normal que les méthodes jouent un rôle fondamental dans les approches qui concernent les échelles nanométriques nous avons eu face à nous des exposés de style très différents depuis le purement scientifique (Berkeley) jusqu'au très technique (Stanford). D'une façon générale c'est cette juxtaposition de problématiques scientifiques et d'instrumentations dédiées qui caractérise en France comme aux Etats-Unis la Biophotonique. De ce point de vue les recherches menées en Europe et aux USA sont similaires. Par ailleurs il est important de noter que rien de ce que nous avons vu n'est 'très impressionnant' par rapport à ce qui se fait en France. Aussi bien du point de vue des problématiques que des techniques. Cependant on note souvent un effort plus prononcé (plusieurs appareillages là où en France nous n'en avons qu'un) et surtout une plus grande souplesse dans la mise en œuvre des opérations de recherche une fois les financements obtenus (dépense des crédits, recrutement des chercheurs, gestion des

locaux...). Le système s'auto-régule par une 'obligation de résultat' qui laisse les moins performants de côté.

Les pistes pour interactions futures.

A plusieurs reprises, nos hôtes nous ont interrogé sur quelles voies pouvait s'appuyer le développement d'une collaboration. Les exposés des attachés ont permis d'apporter plusieurs informations sur les programmes qui peuvent être utilisés, mais il semble que ce soit autour des résultats et du "parler scientifique" que l'adhésion se soit faite (par exemple ceci s'est vu très nettement à Harvard). On note que les équipes leaders de leur domaine n'ont généralement pas grand intérêt à la collaboration et que la compétition est de mise. Sur ce point cette visite nous a certainement permis de mieux connaître nos concurrents et l'état actuel de leur travaux. C'est certainement là une grande réussite de cette mission. Nous pensons tous que ces échanges ont été majoritairement fructueux.

Il y a des groupes ouverts à des réelles interactions (UC Davis par exemple) vers lesquels il s'agira de porter nos efforts. La question qui persiste est 'comment établir une stratégie gagnant/gagnant claire de part et d'autres dès le départ ?' L'idée d'une rencontre l'an prochain en France semble recueillir l'adhésion générale; il faut la préparer avec soin !

V- Remerciements

Mireille Guyader et Roland Hérino:

Cette mission a bénéficié du soutien financier de l'Ambassade de France aux Etats-Unis grâce aux crédits attribués à la Mission pour la Science et la Technologie pour sa réalisation au titre du programme 185. Nous tenons à remercier Michel Israel, Conseiller pour la Science et la Technologie, sans son soutien cette mission n'aurait pas pu avoir lieu. Un grand merci à Raegen Salais du Consulat de San Francisco, Anne Pons, du Consulat de Houston, ainsi qu'à Leah Namoune de l'Ambassade de France à Washington pour leur aide précieuse dans les aspects logistiques de cette mission.

Nous souhaitons remercier particulièrement les membres de la délégation pour leur enthousiasme, le dynamisme avec lequel ils ont pris part à cette mission ainsi que pour la rédaction de ce rapport.

We would like to particularly thank Professor Sunny Xie for hosting the delegation, organizing so nicely the round table discussion at Harvard and the visit in his laboratory. We would like to also thank Professors Louis Brus and Kenneth Eissenthal for hosting the delegation at Columbia University. Special thanks to Dennis Matthews and Frank Chuang for organizing the workshop and the visit at CBST and to all members of the CBST for their warm welcome to the delegation. We are very grateful to Enrico Gratton for organizing the workshop at LFD. Thank you to Professor Graham Fleming for hosting the round table discussion at Stanley Hall at UC Berkeley. We would like also to thank Ehud Isacoff, William Moerner and Stephen Block for hosting the delegation in their laboratories. Finally, thank you to all participants in the workshops: Xiawei Zhuang (Harvard, Boston), Antoine Van Oijen (Harvard Medical School, Boston), Amit Meller (Boston University), James Fujimoto (MIT, Boston), Laura Kaufmann (Columbia University, NYC), Julio Fernandez (Columbia University, NYC), Eric Green (Columbia University, NYC), Thomas Huser (CBST), Sebastian Wachsmann-Hogiu (CBST) James Chan (CBST), Stephen Lane (CBST),

James Boggan (CBST), Steven Chu (LBNL), Jay Groves (UC Berkeley), Jan Liphardt (UC Berkeley), Michelle Digman (LFD, UC Irvine), Christian Hellriegel (LFD, UC Irvine)



Figure 19 : De gauche à droite Didier Marguet, Claude Boccara, Roland Hérino, Antigoni Alexandrou, Mireille Guyader, Valentina Emiliani, Sophie Brasselet, Catherine Royer, Hervé Rigneault et Laurent Cognet