ACADÉMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Electronique.
Formation doctorale : Electronique, Nanotechnologie, Composants et Systèmes.
Ecole Doctorale : Informations, Structures et Systèmes

Etude de la stimulation laser de neurones pour des applications de prothèses visuelles

Présentée et soutenue publiquement

par

Jean-Michel BEC

Le 31 mai 2010

JURY

Christian HAMEL	Directeur de recherche, INM, Montpellier	Président
Jean-Marie BILBAULT	Professeur, LE2I, Université de Bourgogne, Dijon	Rapporteur
Touria COHEN-BOUHACINA	Professeur, C.P.M.O.H, Université Bordeaux 1, Bordeaux	Rapporteur
Yves ROUILLARD	Maître de conférences, IES, Université Montpellier 2	Examinateur
Serge PICAUD	Directeur de recherche, Institut de la vision, Paris	Examinateur
Michel DUMAS	Maître de conférences, IES, Université Montpellier 2	Directeur de thèse
Isabelle MARC	Maître de conférences, IES, EMA, Nîmes	Codirecteur
Fabrice BARDIN	Maître de conférences, IES, Université de Nîmes, Nîmes	Codirecteur
Marie-Catherine PALAU	Directrice de recherche, EADS-Astrium, Les Mureaux	Invité

Remerciements

Avant tout, je voudrais remercier Jean-Marie Bilbault et Touria Cohen-Bouhacina d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Christian Hamel, Yves Rouillard et Serge Picaud pour avoir bien voulu participer à ce jury.

Travailler sur un sujet tel que le mien est une chance. La force de mon sujet tient au fait qu'il s'intègre dans un projet possédant une dimension universelle visant à rendre la perception de leur environnement à des personnes non voyantes. Cette dimension universelle se retrouve chez les personnes participantes au projet.
Au cours de ma thèse, j'ai pu me rendre compte des richesses qu'apporte une collaboration interdisciplinaire comme celle du projet LASDOP. Ce genre de sujet vous pousse à sortir des limites de votre spécialité. En effet, avancer dans mon sujet seul eut été impossible car les domaines de la neuroscience et du médical m'étaient étrangers. Un tel sujet entraine une remise en question permanente, car il n'y a pas de précédent.
En tant que premier doctorant ayant travaillé sur le projet LASDOP, je suis heureux d'avoir participé à ce projet et d'avoir rencontré des personnes passionnantes et passionnées qui m'ont communiqué leur enthousiasme. Une de mes satisfactions personnelles est de constater que la suite de ma thèse correspond à l'émergence de nouvelles perspectives qui montrent le dynamisme et la réactivité d'un tel projet.
Je souhaite souligner que cette étude n'aurait pas a été possible sans les financements et le soutien de la fondation EADS, du LGI2P de l'école des Mines d'Alès, de l'IES, de l'Université de Nîmes, de l'Institut des Neurosciences de Montpellier et de l'Institut ARAMAV.

Merci à Michel Dumas, mon directeur de thèse qui a permis au projet d'exister. Michel, vous n'avez jamais douté que les résultats allaient arriver et je vous ai cru même dans les moments difficiles. Et vous savez quoi ? Vous aviez raison.

Je remercie Isabelle Marc pour son encadrement et pour m'avoir permis d'enseigner au sein de l'école des Mines d'Alès. Ton implication, ton professionnalisme et ta maitrise du sujet ont été primordiaux pour moi du début à la fin de ma thèse.

Un grand merci également à Fabrice Bardin d'être celui qu'il est. Travailler avec toi s'est fait naturellement et a été un grand plaisir. Ta positivité, ton professionnalisme, ton expérience et ton soutien, m'ont permis d'avancer et d'y croire encore.

Mes sincères remerciements à Jean-Claude Borie pour sa bonne humeur, son aide et ses conseils avisés. À travers toi, je tiens à remercier l'ensemble de ta famille pour les très agréables moments que j'ai pu partager avec vous autour d'un bon repas.

Bien sur, je remercie jamkiller plus connu sous le nom del guillermo del Tatur !! Tatbreacker te remercie pour toute l'aide que tu as pu m'apporter sur la programmation Matlab et pour tout le reste. Je ne vais pas mettre toute la liste. En bref, pour résumer : en début de thèse, j'étais content d'avoir un collègue de travail dans mon bureau. Arriver en fin de thèse, je suis heureux de voir un ami tous les jours au travail avec qui il m'est possible de parler (ou faire) de tout et de n'importe quoi (surtout !).

Je remercie bien évidemment toutes les personnes de l'INM où j'ai passé de nombreux jours (mois). Je remercie Christian Hamel et à travers lui la totalité de son équipe de m'avoir permis de venir travailler dans d'excellentes conditions au sein de l'INM. Merci à Olivier Payet pour sa patience et sa disponibilité au cours des différents tests réalisés dans la salle PEV mais aussi pour la qualité de ses réponses à mes nombreuses questions de néophyte. Je remercie également Christian Chabbert et toute son équipe pour le travail qu'ils ont réalisé avec une mention spéciale à Gilles Desmadryl que je qualifierai de véritable machine de guerre du patch clamp qui a était d'une rare disponibilité et d'une efficacité redoutable.
Plus particulièrement, je remercie Sandrine Albert sans qui je n'aurais pas eu de résultats. Les résultats présentés dans ma thèse sont les nôtres. Sans tes compétences et ton travail, nous serions encore dans le noir au sous-sol de l'INM à attendre une réponse des cellules les yeux rivés à l'écran. J'ai vraiment apprécié le travail avec toi et attends avec impatience nos prochaines manips.

Merci à Gérard Dupeyron pour son enthousiasme communicatif pour le projet. Cet homme est un sorcier, quand il parle, le temps semble suspendu, on ne peut que l'écouter et acquiescer de la tête.

J’adresse de sincères remerciements au laboratoire IES où j’ai passé de nombreuses années au cours de mes études et où j’ai rencontré des personnes formidables.
Plus particulièrement, je tiens à remercier Yves Rouillard pour son énorme disponibilité, pour sa patience, pour tout le temps qu’il a pris pour répondre à mes questions et pour effectuer des tests avec moi. Merci également pour leur aide à Aurore Vicet et Sofiane Belahsene.
Je remercie Alain Giani pour son aide et ses précieux conseils qui m’ont permis de gagner un temps précieux lors de mes mesures thermiques.

Je tiens à remercier Fabien Pascal de la confiance dont il a fait preuve à mon égard dans un moment où j’en avais besoin.

Je remercie l’équipe RADIAC dans son ensemble, car ce sont ces différents membres qui m’ont donné l’envie de faire de la recherche. À une certaine période, il m’a été très agréable de me sentir chez moi quand je venais au labo. Remerciement spécial à Marie-Agnès Pettinotti pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Bien entendu, je remercie ma famille pour son soutien et particulièrement ma femme et ma fille de m’avoir supporté pendant cette thèse (et peut-être avant aussi). Merci bien sûr à papa et à maman pour m’avoir soutenu toutes ces années. Je remercie également Laurent qui m’a donné un jour l’occasion de découvrir son monde, monde dans lequel je me suis progressivement installé et finalement épanoui grâce à lui.

Table des Matières

Introduction générale **1**

Chapitre 1 : Etat de l'art **5**

Introduction **7**

1.1. La vision. 8

1.1.1. L'œil et sa rétine. 8

1.1.2. De l'œil au cortex : les aires de la vision. 13

1.1.3. Pathologies rétiniennes. 14

1.1.3.1. La rétinite pigmentaire. 15

1.1.3.2. La dégénérescence maculaire liées à l'âge. 16

1.2. Prothèse visuelle. 18

1.2.1. Les phosphènes. 18

1.2.2. La prothèse visuelle électrique : les techniques utilisées. 19

1.2.2.1. Implant sub rétinien. 20

1.2.2.2. Implant épi rétinien. 21

1.2.2.3. Implant sur le nerf optique. 22

1.2.2.4. Implant cortical et intra cortical. 23

1.2.2.5. Bilan. 23

1.3. Stimulation laser de tissus neuronaux. 25

1.3.1. Utilisations des lasers en ophtalmologie. 25

1.3.2. Stimulation laser de neurones. 27

1.3.2.1. Cellule rendue photosensible. 27

1.3.2.2. Excitation optique de neurone non traité. 29

Conclusion **37**

Chapitre 2 : Mise en œuvre des bancs d'expérimentation de stimulation et de mesures. **39**

Introduction **41**

2.1. Choix des modèles animaux et biologiques. 42

2.1.1. Modèle animal. 42

2.1.2. Modèle biologique. 43

2.1.2.1. Tranche de rétine. 43

2.1.2.2. Culture cellulaire. 44
2.2. Description des bancs de mesures. 46
2.2.1. Test in vitro. 46
2.2.1.1. Technique du patch clamp. 46
2.2.1.2. Technique d'imagerie de fluorescence des ions calciques. 50
2.2.2. Test in vivo. 53
2.2.2.1. L'examen des potentiels évoqués visuels (PEV). 53
2.2.2.2. Dispositif d'enregistrement. 54
2.3. Description du système de stimulation optique 55
2.3.1. Choix et étalonnages des lasers. 55
2.3.1.1. Spectre d'absorption du milieu physiologique. 55
2.3.1.2. Caractérisation des lasers utilisés. 59
2.3.1.3. Etalonnage des lasers de puissance utilisés. 62
2.3.2. Commande des lasers. 67
2.3.2.1. Source de courant continu modulé en fréquence LDX3232. 67
2.3.2.2. Carte d'acquisition/stimulation. 68
2.3.2.3. Programme de commande avec le logiciel LabVIEW. 69
2.3.3. Les bancs de tests in vitro. 74
2.3.3.1. Imagerie calcique. 74
2.3.3.2. Station patch clamp. 75
2.3.4. Le banc de test in vivo. 81
2.3.4.1. Adaptation de la fibre optique sur une aiguille. 82
2.3.4.2. Récupération et acquisition du signal de synchronisation. 83
Conclusion 85

Chapitre 3 : Résultats. 87
Introduction 89
3.1. Estimation de l'énergie reçue par le neurone. 90
3.1.1. Forme du signal en sortie de fibre. 90
3.1.2. Position de la fibre 91
3.1.3. Absorption. 93
3.1.4. Calcul de la puissance reçue par les cellules. 94
3.2. Paramètre de stimulation. 96

3.2.1. Imagerie calcique. 96
3.2.1.1. Notion de seuil de stimulation et de destruction. 97
3.2.1.2. Détermination des seuils d'énergie de stimulation. 100
3.2.1.3. Impact du positionnement de la fibre. 109
3.2.1.4. Autres caractéristiques des réponses. 111
3.2.2. Tests d'électrophysiologie par la technique du patch clamp. 114
3.2.2.1. Protocole de mesure 114
3.2.2.2. Description des réponses. 115
3.2.2.3. Détermination des seuils d'énergie 122
Conclusion 126

Chapitre 4 : Etude des mécanismes d'interaction laser-neurone. 129
Introduction 131
4.1. Etude de l'interaction du laser avec le tissu. 132
4.1.1. Effet photochimique. 133
4.1.2. Effet thermique 133
4.1.3. Effet de photoablation. 136
4.1.4. Effet mecanique. 136
4.2. Hypothèse de mecanismes d'interaction lors de la stimulation laser de neurone .. 136
4.3. Identification des mecanismes biophysiques mis en cause 139
4.3.1. Tests pharmacologiques. 140
4.3.1.1. Tests pharmacologiques réalisés en imagerie calcique. 140
4.3.1.2. Tests pharmacologiques réalisés en électrophysiologie. 142
4.3.1.3. Recherche du ou des mécanismes biologiques impliqués. 143
4.3.2. Etude physique de l'effet thermique. 144
4.3.2.1. Quantification de l'élévation de la température 144
4.3.2.2. Simulation de l'augmentation de la température. 146
Conclusion 154

Conclusion générale 155

Annexes 161

Bibliographie 173

Introduction générale

Cette thèse s'intègre dans un projet global de conception de prothèse visuelle à stimulation laser pour les personnes atteintes de maladies de la rétine : le projet LASer Driven Optical Prosthesis (LASDOP). Ce projet a pour objectif d'augmenter l'autonomie et la sécurité des patients dans leurs déplacements en leur permettant de détecter les mouvements, les zones lumineuses et les obstacles présents autour d'eux. Il est porté par l'équipe STINIM, dirigée par M. Michel Dumas de l'Institut d'Electronique du Sud (IES) lui-même dirigé par M. Daniel Gasquet.

L'activité de l'équipe STINIM étant principalement tournée vers l'optique, l'électronique, l'instrumentation et la physique, les compétences touchant au médical et aux neurosciences devaient être trouvées à l'extérieur. LASDOP est un projet fédérateur qui a nécessité une participation et une collaboration pluridisciplinaires et qui a permis de dépasser les frontières de nos spécialités respectives. Cette collaboration a permis d'établir progressivement un vocabulaire commun à tous les intervenants pour que chacun puisse comprendre les méthodes et les techniques employées par les autres spécialités. Le travail réalisé par chacun des partenaires correspond à la réflexion et à la prise de décision collective de chaque discipline intervenant sur le projet.

Dès le départ, il est apparu nécessaire de ne pas limiter le projet aux aspects purement technique et biologique, mais d'intégrer le patient et ses besoins en collaborant avec des professionnels de la santé et de la rééducation. La chance du projet est d'avoir sur Nîmes l'ARAMAV dont le président est Mr Camille Lapierre, qui est une clinique de rééducation et de réadaptation fonctionnelle de la malvoyance et de la cécité. Cet institut est l'un des deux seuls en France dont la mission est d'aider les personnes déficientes visuelles à développer toutes leurs possibilités personnelles, à favoriser leur réinsertion familiale, sociale et éventuellement professionnelle.

L'équipe STINIM a ainsi pu prendre en considération les besoins des patients en interrogeant chacun des membres du corps médical et paramédical intervenant à l'ARAMAV. Ces avis sont pris en considération pour définir l'information et mettre en forme l'information nécessaire permettant à la personne implantée de retrouver une autonomie dans ces déplacements en évitant les obstacles fixes ou en mouvement. Cette étude est réalisée dans le cadre de la thèse de Mr Guillaume Tatur (soutenance prévue fin 2010).

L'équipe travaille également avec le docteur Gérard Dupeyron, chef du service d'ophtalmologie du CHU de Nîmes ce qui permet d'avoir un avis objectif sur les choix technologiques à prendre en considération pour l'aspect chirurgical et médical du projet.

La deuxième approche novatrice du projet est l'étude d'une nouvelle méthode de stimulation neuronale. En effet, de plus en plus d'équipes de recherche de par le monde se consacrent à la mise au point de prothèses visuelles, parfois abusivement appelées « rétines artificielles ». Mais jusqu'à présent, la majorité des projets en cours utilisent une stimulation d'origine électrique, les travaux de recherche étant consacrés à la forme et au nombre d'électrodes. Cette stimulation par voie électrique, portée par les progrès de la microélectronique, a déjà fait ses preuves dans de nombreux types de neuroprothèses, actuellement couramment utilisées. Cependant, elle présente quelques inconvénients, notamment en ce qui concerne la stimulation de la rétine qui est un tissu très fin, fragile et difficile d'accès. Il apparaît donc intéressant d'étudier une nouvelle méthode de stimulation, qui pourrait s'avérer plus efficace pour ce type de stimulateur neuronal. C'est cette partie du projet qui m'a été confié pendant cette thèse : vérifier la faisabilité de l'excitation neuronale par laser grâce à la conception et à la mise au point de différents bancs de mesure, optimiser les paramètres physiques de la stimulation et tenter d'élucider les phénomènes biologiques mis en jeu.

La partie du projet concernant la stimulation de la rétine est développée conjointement par l'équipe STINIM et deux équipes de l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM) sous la direction de Mr Christian Hamel : l'équipe Génétique et thérapie des cécités rétiniennes dirigée par Mr Guy Lenaers et l'équipe Physiopathologie et Thérapie des Désordres Vestibulaires dirigée par Mr Christian Chabbert.

La réalisation de ma thèse n'aurait pas était possible sans Mlle Emmanuelle Albert, doctorante de l'INM. L'interdépendance de nos thèses respectives permet d'étudier l'effet de la stimulation du point de vue des mécanismes physiques et biologiques mis en cause. Cet effort de compréhension des phénomènes apparaissant au niveau de la cellule même est aussi un point original : d'autres équipes de recherche ont déjà mis en évidence l'excitation optique de tissus neuronaux (nerf sciatique et cochlée principalement), mais grâce à des études in vivo, qui ne permettent pas l'élucidation des mécanismes biologiques.

Enfin, la stimulation optique désirée étant réalisée avec des diodes lasers se situant dans l'infrarouge, le projet a pu être initié grâce aux lasers fabriqués par l'équipe composants à NANOstructures pour Moyen InfraRouge (NANOMIR) dirigée par Eric Tournié du laboratoire IES. Cette équipe spécialisée dans la réalisation et l'étude des composants photoniques, sources lasers et photodétecteurs, a mis à notre disposition son expertise et ses méthodes de caractérisation indispensable à notre étude, grâce à la collaboration de Mr Yves Rouillard, Mme Aurore Vicet et Mr Souad Moumdji.

Cette thèse s'organise autour de quatre chapitres.

Le chapitre intitulé « Etat de l'art des prothèses visuelles et de la simulation laser de neurone» introduit les connaissances indispensables à la compréhension du sujet. Ce chapitre correspond à la démarche personnelle que j'ai effectuée du début jusqu'à la fin de ma thèse afin de m'approprier la problématique biologique du sujet. N'ayant reçu aucune formation en biologie, ce premier chapitre reflète les étapes de compréhension successives que j'ai franchies avec l'aide de mon équipe et grâce aux nombreuses explications de nos partenaires.
Ce chapitre décrit le fonctionnement de l'œil et de la rétine ainsi que les principales pathologies qui la touchent. Il donne un aperçu des projets de prothèses visuelles électriques actuellement développés, avant de parler d'un nouveau type de stimulateur basé sur la lumière, utilisé sur des tissus neuronaux autres que la rétine. Nous verrons ce que cette stimulation optique permet déjà de réaliser et ce qu'il ressort des résultats présentés par les différentes équipes de recherche travaillant sur ce sujet. La stimulation laser IR de cellule rétinienne n'ayant à notre connaissance jamais était réalisée.

Le chapitre suivant qui s'intitule « Mise en œuvre des bancs d'expérimentation de stimulation et de mesures », présente les travaux réalisés pour la conception du banc de stimulation laser et son adaptation aux différents appareils de mesure présents à l'INM. Chaque partie du banc de stimulation telle que le banc optique ou le logiciel de commande de la source de courant y est décrite. Afin de comprendre les choix technologiques et stratégiques au cours du travail d'adaptation réalisé sur les bancs de mesure de l'INM, une description du matériel et des techniques de mesures employés est réalisée.

Le troisième chapitre intitulé « Résultats expérimentaux » présente les réponses obtenues avec les deux techniques de mesures utilisées et apporte la démonstration de principe de la stimulation laser de neurones de la rétine. Il présente le programme de simulation qui permet de quantifier les seuils d'énergie de stimulation au niveau de la cellule en prenant en considération la longueur d'onde et les paramètres de positionnement des différents éléments du banc de stimulation. L'aspect des réponses biologiques au cours des stimulations optiques est traité dans cette partie sans prendre en considération l'aspect biologique qui ne concerne pas mon étude.

Pour clore ce travail, le quatrième chapitre intitulé « Etude des mécanismes d'interaction laser-neurone » traite des effets physiques qui peuvent apparaitre lors de la stimulation laser et provoquer la réaction du neurone. Il présente les moyens mis en œuvre pour identifier la réaction biologique responsable de la réponse cellulaire : il s'agit d'une part d'une étude pharmacologique préliminaire visant à mieux cerner les mécanismes au niveau

membranaire, et d'autre part du développement d'un modèle numérique permettant de connaître l'élévation de température au cours de la stimulation. Ce point repose sur une étude de la littérature donnant l'hypothèse d'un effet thermique prédominant.

Je finirai mon manuscrit, par une analyse critique de l'ensemble des résultats obtenus et des recherches et perspectives que l'équipe STINIM et le consortium LASDOP souhaite mettre en œuvre. Cette analyse tient compte des évolutions et résultats obtenus par d'autres équipes de recherches qui développent des techniques complémentaires.

Chapitre 1 : Etat de l’art

Introduction

Le rôle de ce chapitre est de donner une vision précise du sujet en fournissant les éléments essentiels à la compréhension des aspects physiques et biologiques qui y sont abordés. N'étant pas issu d'une formation en biologie, ce sujet m'a demandé un travail d'investigation préliminaire qui a commencé par l'étude du fonctionnement de l'œil jusqu'aux mécanismes mis en jeu dans le transfert de l'information d'un neurone vers le cerveau. La première partie de ce chapitre suit cette démarche progressive et permettra au lecteur non biologiste de s'approprier le sujet.

Ce chapitre débute donc par une description biologique du système visuel en détaillant plus particulièrement le fonctionnement de l'œil et de la rétine qui sont à l'origine de la perception visuelle. Nous présenterons les pathologies rétiniennes responsables de la majorité des cas de cécité dans le monde en insistant sur celles n'ayant pas de traitement et dont la seule alternative reste la prothèse visuelle.

La partie suivante commence par un bilan concernant les projets de prothèses visuelles électriques qui représentent la méthode majoritairement étudiée dans le monde. Nous détaillerons les résultats obtenus sur des personnes implantées en comparant les différentes stratégies et techniques d'implantations employées. Nous dresserons un inventaire des limitations et des difficultés liées à ce type de prothèse.

Ce bilan fait, nous introduirons ensuite un nouveau type de stimulation basé sur la lumière laser. Nous nous intéresserons aux résultats présentés par les différentes équipes de recherche travaillant sur l'excitation optique de tissus neuronaux et présenterons les différentes approches mis en œuvre pour la réaliser à différentes longueur d'ondes (UV, visible et infrarouge).

Mon sujet de thèse concernant la stimulation au moyen d'un laser infra rouge de cellules rétiniennes (stimulation n'ayant à notre connaissance jamais était réalisée), la dernière partie sera consacrée à une synthèse des résultats présents dans la littérature permettant d'identifier les critères de sélection de la longueur d'onde ainsi que l'impact des paramètres de stimulation sur les réponses biologiques obtenues.

1.1. La vision.

Cette partie vise à décrire les différentes étapes permettant à l'homme d'obtenir une vision de son environnement. Cette représentation visuelle devient possible par le traitement successif des différentes couches composant le système psychosensoriel de la vision. Cette partie a été écrite en grande partie à partir du livre de Robert W.Rodieck sur la vision [1]. Elle détaille les étapes du système visuel en insistant plus particulièrement sur l'œil et la rétine. Nous décrirons brièvement son fonctionnement, en détaillant le rôle que tient chacun de ses principaux éléments dans la création et le transfert de l'information nerveuse.

1.1.1. L'œil et sa rétine.

La structure de l'œil peut être comparée à celle d'un appareil photographique constitué d'un objectif, d'une chambre noire et d'un film photosensible. La partie avant de l'œil correspond à l'objectif formé d'une lentille : la cornée, d'un diaphragme : la pupille contrôlée par l'iris et d'une lentille arrière : le cristallin. L'intérieur du globe oculaire constitue la chambre noire et le rôle du film photographique est tenu par la rétine (Figure 1). En revanche, la grande différence avec l'appareil photo est qu'une première étape de traitement est directement réalisée par la rétine.

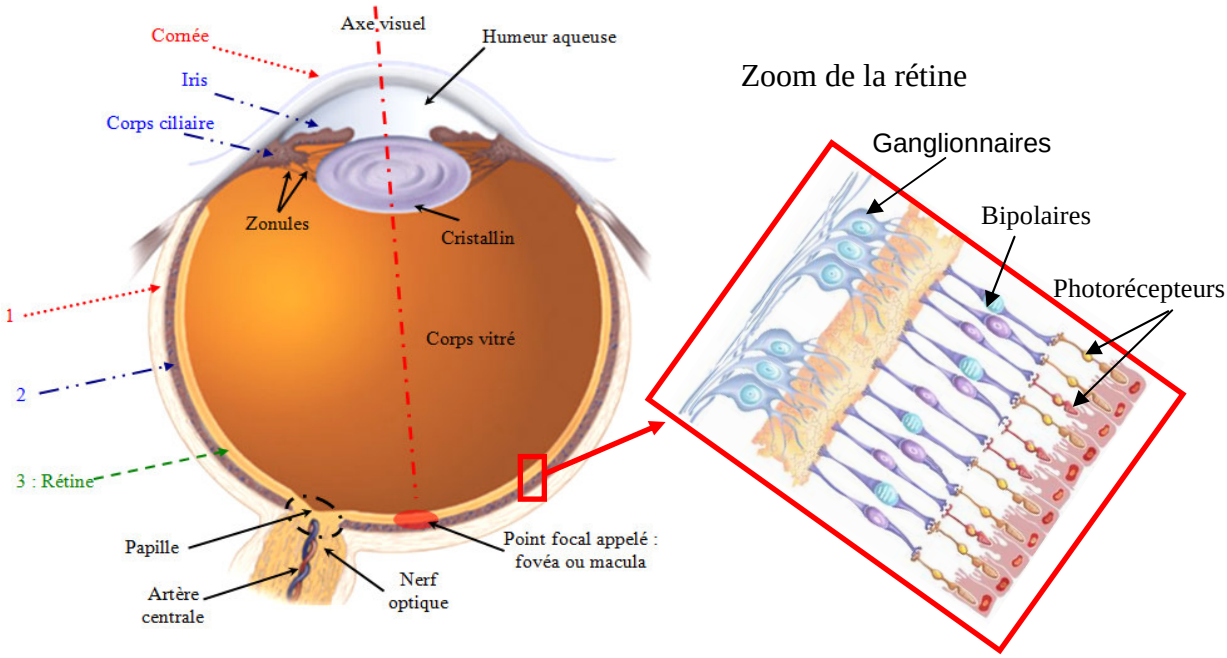


Figure 1 : Anatomie de l'œil avec ses trois enveloppes. [2].
1 : couche sclérotique, 2 : couche choroïde, 3 : rétine.

La rétine est constituée de couches nerveuses complexes qui réalisent un prétraitement de l'information avant de l'envoyer vers les aires visuelles du cerveau. Elle effectue une conversion du signal lumineux en signal électrique via des échanges biochimiques réalisés au niveau de ses photorécepteurs : phénomène de transduction. Cette information électrique subit, par le biais de cellules spécialisées, un traitement successif au travers des différentes couches cellulaires de la rétine. Si l'on suit le parcours des rayons lumineux incidents, on rencontre dans l'ordre de bas en haut (Figure 2) :

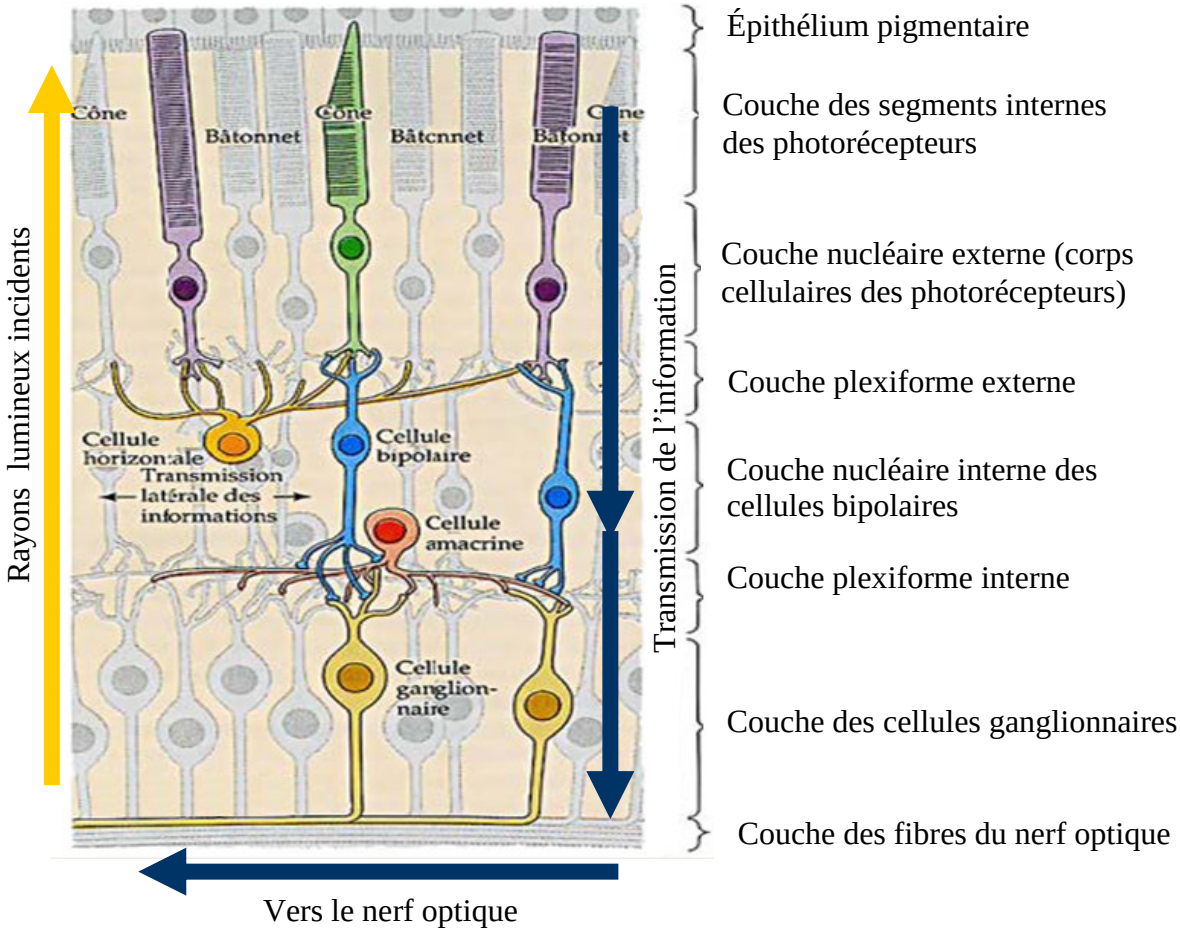


Figure 2 : Détails des différentes couches de la rétine [2].

La rétine est donc constituée des couches nucléaires superposées suivantes :

- On peut s'étonner à première vue de la disposition des cellules photoréceptrices qui implique que la lumière doit traverser les différentes couches cellulaires de la rétine avant de les atteindre. Cette configuration permet à la rétine d'être positionnée contre l'épithélium pigmentaire, tissu composé de cellules juxtaposées qui remplit deux fonctions physiologiques

au niveau des photorécepteurs : une nutritive et une de recyclage des déchets créés lors de la transduction.

- Couche des photorécepteurs :

On y trouve les cônes et les bâtonnets qui sont les récepteurs qui transforment le stimulus lumineux en stimulus nerveux (transduction). Ils se distinguent par leur forme, leur fonction et leur localisation respective sur la rétine (Figure 3).

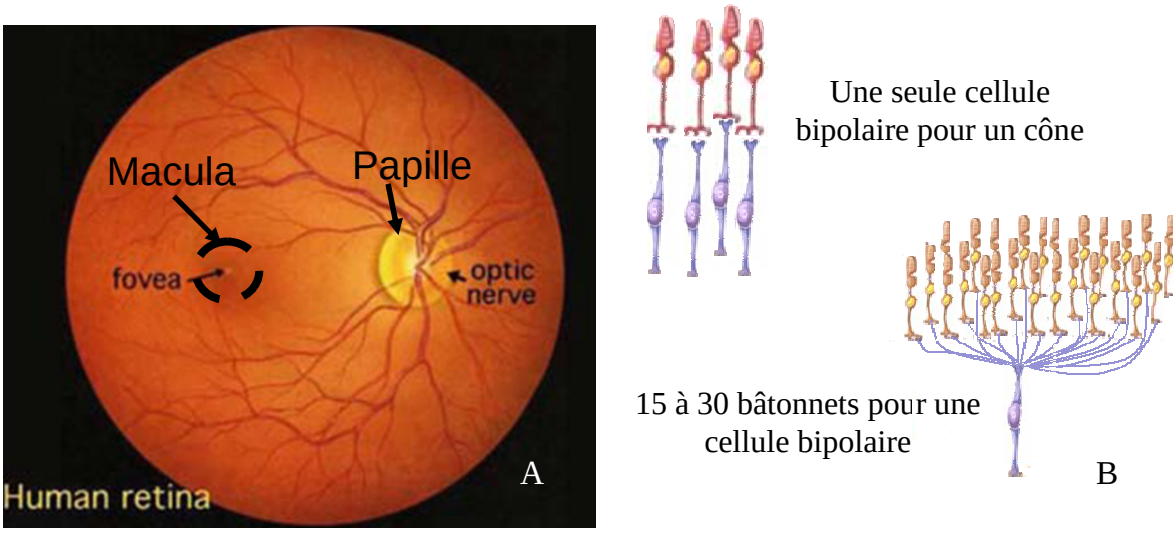


Figure 3 : (A) Fond d'œil humain, (B) Schéma des cônes et bâtonnets associés à une cellule bipolaire (D'après : Rodieck [1]).

- Les cônes sont concentrés en grande majorité dans la région de la macula, zone d'environ 2 mm qui correspond au point focal du signal optique. La macula assure une vision utilisée pour la lecture ou toute autre activité demandant une très bonne acuité visuelle dans des conditions de forte luminosité. Cette précision est possible, car chaque cône possède une voie de traitement qui lui est propre. En effet, un cône envoie son information à une seule cellule bipolaire. Moins nombreux que les bâtonnets (6 à 7 millions) et bien groupés dans l'axe optique, ils permettent une vision précise photopique[1] grâce aux trois variétés de pigments qu'ils renferment. Les trois pigments sont présents dans tous les cônes, mais à différents degrés de concentration. Cette différence permet de les classer en trois catégories correspondantes à la longueur d'onde d'absorption maximale des différents pigments. Les cônes S sont sensibles au bleu (longueur d'onde « Short » : 437 nm), les cônes M au vert (longueur d'onde « Medium » : 533 nm) et les cônes L au rouge (longueur

[1] Vision de jour, colorée.

d'onde « Long » : 564 nm). La perception d'un objet de couleur demande la contribution de ces trois types de cônes. Chacun d'eux donne une réponse correspondante à leur sensibilité au spectre d'absorption. La juxtaposition de ces trois résultats donne notre perception des couleurs.

- Les bâtonnets sont très nombreux (environ 130 millions) et sont situés majoritairement dans la « rétine périphérique », c'est-à-dire autour de la macula (Figure 3.A). Contrairement aux cônes, les bâtonnets se rassemblent en groupe pour converger vers une seule cellule bipolaire. Cette disposition permet une très bonne sensibilité dans la pénombre du fait que plusieurs bâtonnets vont envoyer leur signal simultanément sur une même cellule bipolaire. Ainsi, si très peu de photons sont captés par les photorécepteurs, la cellule bipolaire réagit comme un amplificateur de signal et permet de passer l'information. Il ne s'agit pas d'un système point à point, mais d'un système de faible résolution spatiale basé sur la convergence de l'information. Elle permet une vision périphérique (d'alerte) très efficace pour une vision scotopique[2] ou dans la pénombre (nuance de gris), mais ne permet pas une vision fine.

- Couche nucléaire externe :

Couche qui contient les corps cellulaires des photorécepteurs.

- Couche plexiforme externe : Couche contenant les synapses entre les cellules photoréceptrices, bipolaires et horizontales.

- Couche nucléaire interne :

Couche qui contient les corps des cellules bipolaires, horizontales et amacrines. Une fois le stimulus lumineux converti en stimulus nerveux par les photorécepteurs, il est transmis aux cellules bipolaires. À travers les cellules bipolaires, et leurs diverses connexions dendritiques, un premier traitement de l'information est réalisé. Cette information est propagée le long de la membrane plasmique puis de l'axone de la cellule bipolaire et arrive à la terminaison synaptique d'où elle transitera vers une cellule ganglionnaire.

- Couche plexiforme interne :

Couche contenant les synapses entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires.

[2] Vison nocturne, achromatique.

- Couche des cellules ganglionnaires :

La fonction première des cellules ganglionnaires et de recevoir les dépolarisations transmembranaires issues des cellules amacrines et bipolaires et d'envoyer, si l'information reçue est suffisante, un signal au cerveau sous forme de potentiels d'action (PA). Ces PA se propagent le long de leurs axones qui en se regroupant, forment le nerf optique au niveau de la papille optique. Le potentiel transmembranaire est dû à un flux dynamique d'ions traversant en permanence la membrane des cellules ganglionnaires via des canaux spécifiques. Lorsque le potentiel membranaire augmente brièvement et suffisamment, il peut atteindre une valeur seuil qui provoque l'ouverture de deux types de canaux ioniques sensibles au voltage (sodium et potassium). L'ouverture de ces canaux provoque une inversion brusque, transitoire et maximum du potentiel qui se propage sans atténuation tout le long de son axone (Figure 4). Le neurone possède donc un mode de fonctionnement binaire de tout ou rien.

La particularité de la cellule ganglionnaire est qu'elle possède, au niveau de son segment initial, une concentration importante de canaux sensibles au voltage (Annexe 1).

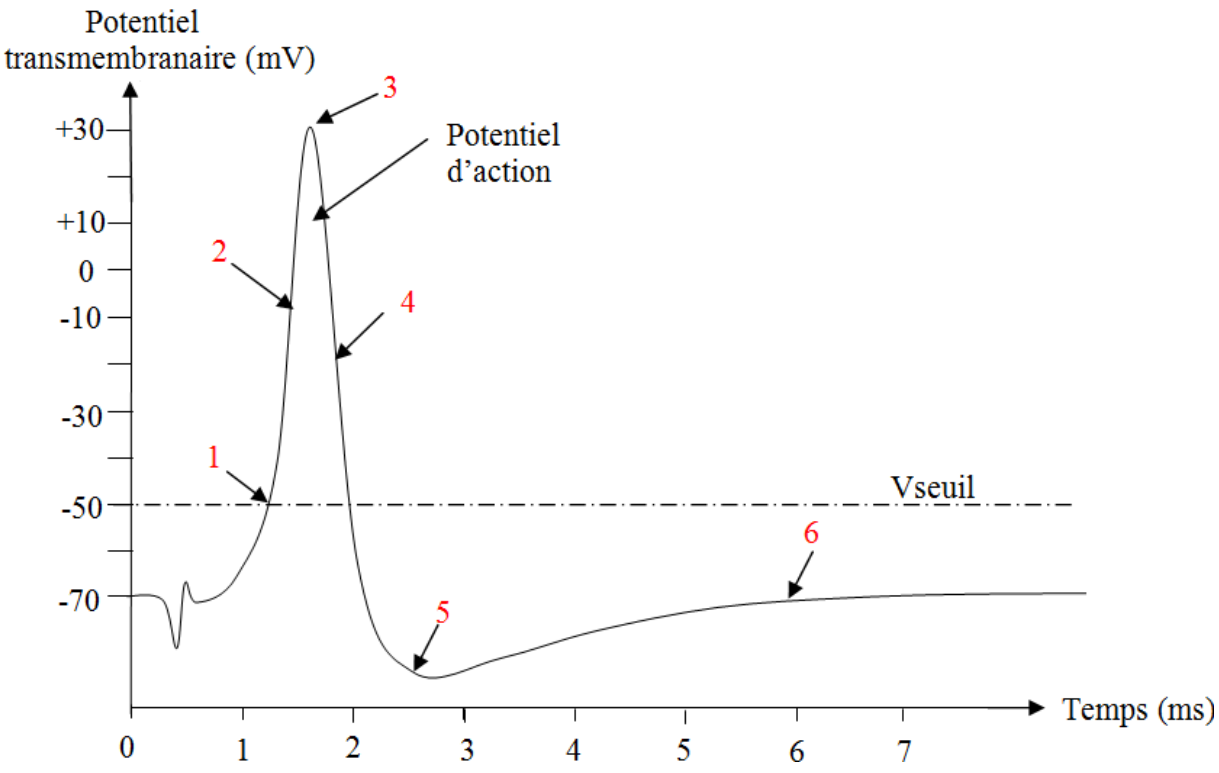


Figure 4 : Allure d'un potentiel d'action.
1 Les canaux sodiques s'ouvrent, 2 : L'entrée d'ions sodium dépolarise la membrane, 3 : Ouverture des canaux de potassium et fermeture des canaux de sodium, 4 : Sortie des ions potassium, 5 : Période réfractaire, 6 : Retour au potentiel d'équilibre.

Un potentiel d'action correspond à la variation positive du potentiel de membrane qui dure près d'une milliseconde. C'est par sa génération et son acheminement par les axones que les cellules ganglionnaires transmettent l'information nerveuse au cerveau. Le potentiel d'action généré au niveau des cellules ganglionnaires est transmis le long de l'axone myélinisé[3] à une vitesse de 100 m/sec.

La rétine permet de passer d'un système de codage en amplitude au niveau des photorécepteurs et des cellules bipolaires, en un système de codage en fréquence (fréquence des potentiels d'action). La fréquence de potentiels d'actions varie en effet, proportionnellement au niveau d'amplitude de la stimulation (Figure 5).

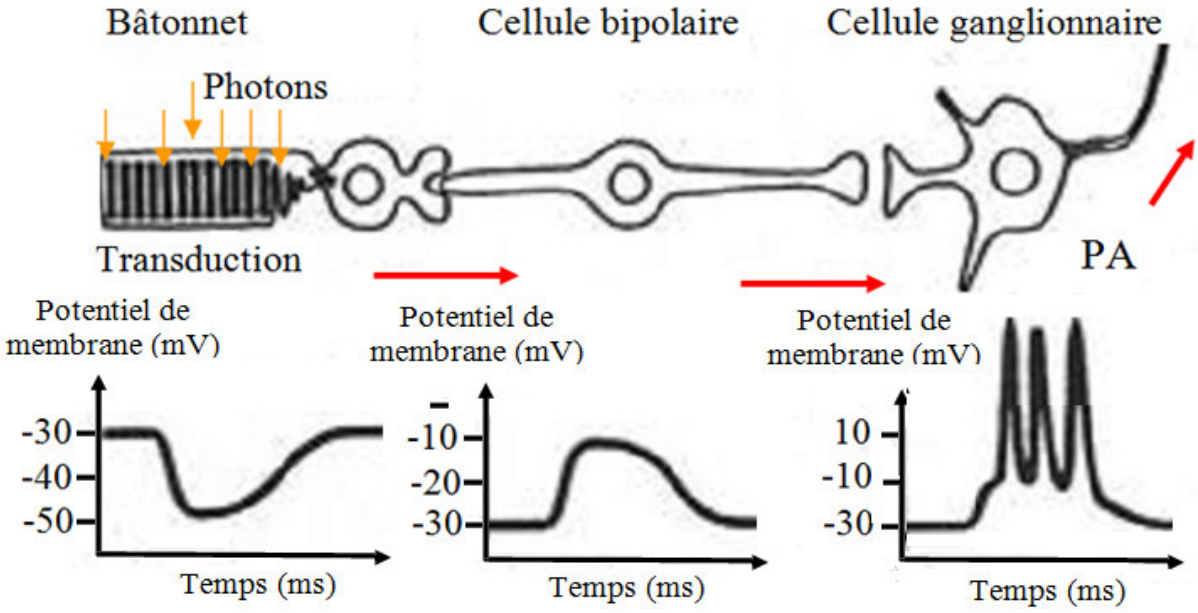


Figure 5 : Traitement et transfert de l'information au travers des couches de la rétine [3].

1.1.2. De l'œil au cortex : les aires de la vision.

Le traitement effectué par l'œil et plus particulièrement la rétine correspond à la première étape permettant la représentation mentale et la perception de notre environnement. L'information traitée par la rétine servira à envoyer ou non, un message nerveux au cerveau via la chaîne d'acquisition psychosensorielle de la vision (Figure 6).

[3] La myéline est une gaine lipidique de protection qui permet d'améliorer la conductivité des nerfs.

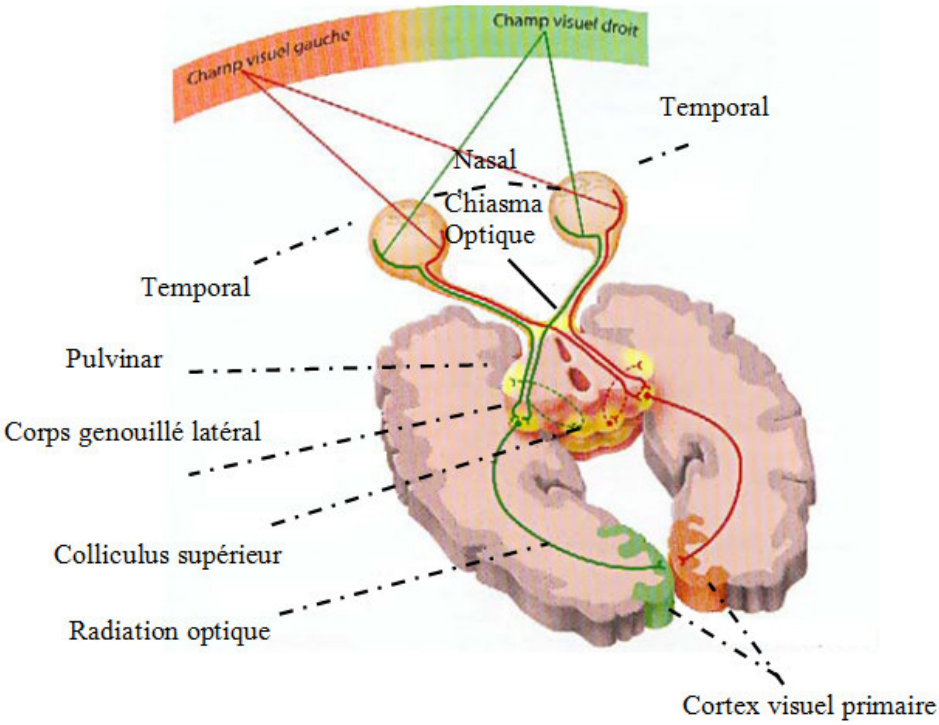


Figure 6 : Chaîne d'acquisition psychosensorielle de la vision.

Le signal lumineux converti en stimulus électrique se propage le long du nerf optique vers les centres visuels du cerveau. Ces derniers participent notamment aux mouvements du regard et au contrôle du diamètre pupillaire. Le nerf optique se partage en deux branches, une qui rejoint le corps genouillé latéral du thalamus, la seconde qui rejoint le colliculus supérieur et pulvinar. L'information est ensuite transmise au cortex visuel primaire constitué des aires visuelles corticales.

1.1.3. Pathologies rétiniennes.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe les déficiences visuelles en deux catégories : la basse vision et la cécité [4]. La basse vision est diagnostiquée pour une acuité visuelle comprise entre 6/18ème et 3/60ème sur l'échelle de Snellen[4] qui correspond à un champ de vision[5] compris entre 10° et 30°. La cécité est définie pour une acuité visuelle inférieure à 3/60ème ou encore un champ de vision de moins de 10°.

[4] L'échelle de Snellen est un test standard de détermination de l'acuité visuelle basé sur la reconnaissance de caractères (lettres).
[5] Le champ visuel est la zone de l'espace perçue alors que les yeux restent immobiles.

Dans les dernières études de l'OMS, il apparaissait qu'à l'échelle mondiale, le nombre de personnes atteintes d'une déficience visuelle dépassait les 161 millions, dont environ 37 millions de non-voyants [5, 6].

La répartition de ce nombre dans le monde n'est pas uniforme et dépend de trois facteurs :

- facteur géographique : la grande majorité des cas sont concentrées dans les régions les moins développées,
- facteur lié à l'âge : les adultes de 50 ans et plus étant les plus touchés,
- facteur sexuel : les femmes présentent un risque significativement plus important de souffrir de déficience visuelle que les hommes.

Malgré les progrès réalisés par la chirurgie dans de nombreux pays au cours des dernières décennies, la cataracte demeure la cause principale de déficience visuelle dans toutes les régions du monde (47,9 % des déficiences), à l'exception des pays développés [5]. Les autres causes majeures de déficience visuelle sont par ordre d'importance, le glaucome[6] (12,3 %), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (8,7 %), les opacités cornéennes (5,1%), la rétinopathie diabétique (4,8%), la cécité des enfants (3,9 %) et le trachome[7] (3,6 %). Différentes stratégies pour traiter ces pathologies peuvent être mises en application : pharmacologique ou chirurgicale. Mais certaines d'entre elles ne peuvent pas être traitées par ces moyens. C'est le cas notamment de la DMLA et de la Rétinite Pigmentaire (RP). De ce fait, d'autres solutions sont à l'étude, en particulier par thérapie génique et par des prothèses. Nous présentons plus en détails ces deux pathologies dans la partie suivante.

1.1.3.1. La rétinite pigmentaire.

La Rétinite Pigmentaire (RP) est une dégradation des cellules due au dysfonctionnement de l'épithélium qui ne traite plus les déchets issus de la transduction. Ceux-ci, en s'accumulant, entraînent une dégénérescence progressive des cellules (Figure 7). Le cas le plus courant de rétinite pigmentaire est celui qui présente une dégénérescence première des bâtonnets suivi d'une dégénérescence secondaire des cônes. La maladie se manifeste au départ par une héméralopie[8] et une perte de la vision périphérique. Cette

[6] Pathologie qui augmente la pression à l'intérieur de l'œil, susceptible d'entraîner une lésion du nerf optique à son origine (sur la rétine).
[7] Inflammation de l'intérieur des paupières provoquant des séquelles et une cécité.
[8] Baisse de la vision nocturne ou en milieu faiblement éclairé.

dégénérescence gagne progressivement le champ visuel central. Il s'agit d'une maladie héréditaire pour laquelle il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement médical. Les premiers symptômes apparaissent généralement entre la dixième et vingtième année de la vie du sujet. Une personne atteinte devient progressivement aveugle en quelques dizaines d'années. Chaque année une naissance sur 5000 présente cette pathologie ce qui comptabilise, rien qu'en France, un total de 35 000 patients atteints de rétinopathies pigmentaires.

Récemment un traitement par thérapie génique réalisé par une équipe américaine et une équipe anglaise a permis de stopper la progression d'une forme très rare de RP : l'Amaurose Congénitale de Leber (LCA) chez 6 patients [7, 8]. Cette technique consiste à se servir d'un virus synthétique qui infecte les cellules malades et rajoute le gène manquant tout en supprimant la partie pathogène. Durant les semaines qui ont suivi l'opération, les trois patients américains et l'un des patients britanniques ont recouvré des sensations visuelles leur permettant de percevoir des zones lumineuses. L'un d'entre eux parvient à éviter des obstacles. Ces résultats encourageants entretiennent l'espoir de voir de tels traitements se généraliser aux autres pathologies rétiniennes.

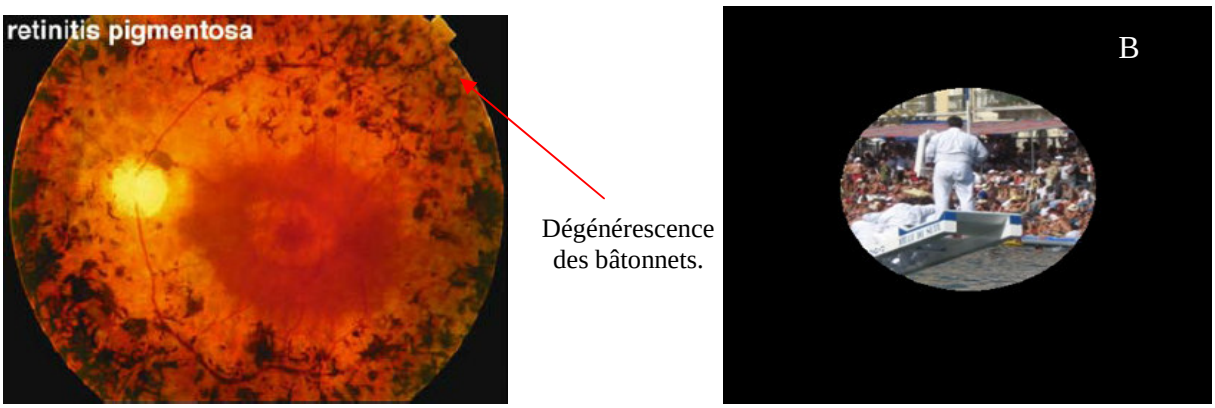


Figure 7 : Rétinopathie pigmentaire à bâtonnets prédominants.
A : Fond d'œil d'un patient atteint par la RP. (D'après : Humayun [10]).
B : Vue simplifiée du champ visuel d'un patient.

1.1.3.2. La dégénérescence maculaire liées à l'âge.

La dégénérescence maculaire provoque une baisse progressive de la vision centrale (Figure 8). La vision centrale servant à la vision des détails, il devient impossible au sujet de lire, conduire ou réaliser des actions demandant une grande acuité. Son champ visuel périphérique est épargné ce qui permet au patient de garder une autonomie pour se déplacer et

interagir avec son environnement. Il s'agit d'une maladie qui se manifeste chez des sujets ayant atteint généralement les 50 ans, elle est ainsi appelée « Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age » (DMLA). Il est reporté que 37 % des personnes âgées de plus de 75 ans sont touchés par la DMLA, faisant d'elle la deuxième cause de cécité derrière la cataracte dans les pays développés et la troisième cause dans le monde [6]. En France il s'agit de la première cause de malvoyance touchant près d'un million de personnes, ce nombre devrait être multiplié par 3 d'ici à 25 ans, compte tenu de l'allongement de la durée de vie.

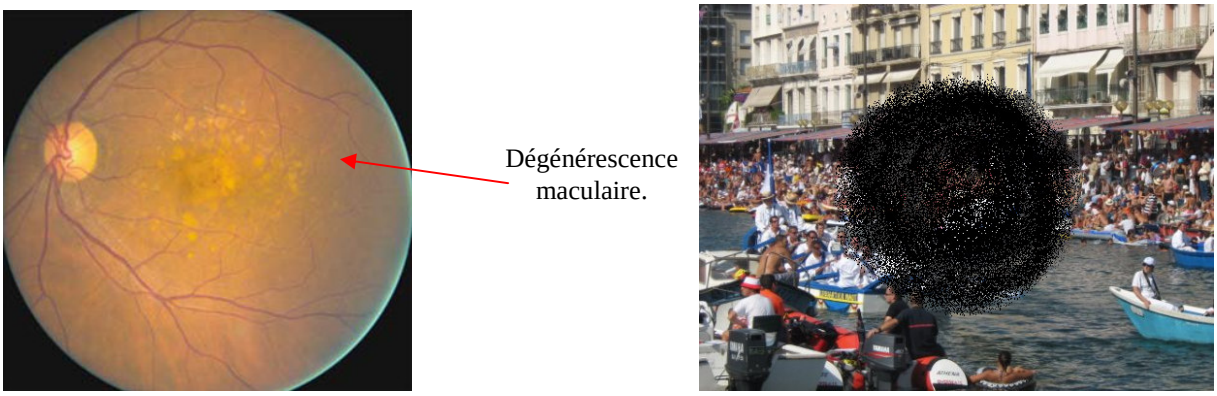


Figure 8: Dégénérescence maculaire liée à l'âge.
A : Fond d'œil d'un patient atteint par la DMLA (D'après : Humayun [10]).
B : Vue simplifiée du champ visuel d'un patient.

Dans le cas d'une RP ou d'une DMLA, la maladie, en évoluant, a tendance à se propager à la rétine entière. Dans les deux cas, l'évolution de la maladie entraine une dégénérescence des cellules ganglionnaires qui ne sont plus sollicitées par les cellules bipolaires et photoréceptrices. Or, il est prouvé que le taux de survie des cellules ganglionnaires reste élevé pendant une durée relativement longue après l'établissement de la cécité [6]. Cette donnée, associée au fait que ces cellules sont relativement faciles d'accès, fait de ces dernières des cibles intéressantes pour des méthodes de stimulation artificielle. Parallèlement à la recherche de traitements thérapeutiques, la mise en œuvre d'une prothèse visuelle se présente comme une solution alternative qui permettrait la restauration artificielle des fonctions visuelles. Les travaux des principales équipes dans ce domaine sont détaillés ci-après.

1.2. Prothèse visuelle.

Une prothèse visuelle est un système artificiel visant à restaurer totalement ou en partie la fonctionnalité de la chaîne psychosensorielle de la vision. Ce système vise une population de personnes ayant perdu en totalité la vue. Elle peut être décomposée en trois parties distinctes (Figure 9).

- L'information est captée par un capteur de type caméra.
- L'information jugée pertinente est extraite et traitée pour la commande du stimulateur.
- Le stimulateur excite des neurones de la rétine, du nerf optique ou du cerveau, sans les dégrader.

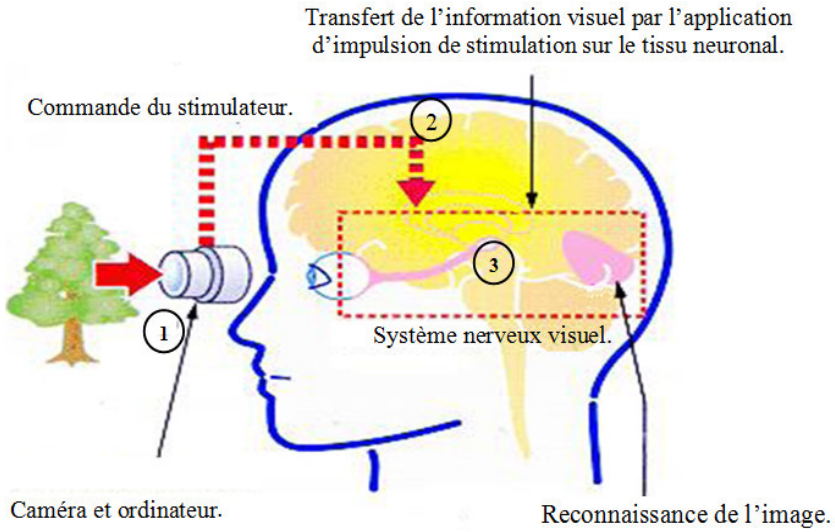


Figure 9 : Vue simplifiée d'un système de prothèse visuelle basée sur la stimulation électrique.
1 : acquisition de l'image par un capteur. 2 : extraction et mise en forme de l'information. 3 : stimulation des cellules nerveuses.

Il existe différentes manières de stimuler les voies optiques qui visent toutes à provoquer l'apparition d'une sensation lumineuse appelée phosphène.

1.2.1. Les phosphènes.

L'apparition de phosphènes est un phénomène entoptique[9] caractérisé par la sensation de percevoir de la lumière sous forme de points ou zones lumineuses. Elle peut être causée par une stimulation mécanique, électrique ou magnétique de la rétine ou du cortex visuel. Charles Leroy, un chimiste et physicien français, fut le premier en 1755 à prouver la faisabilité d'un

[9] Excitation du système visuel par un stimulus autre que la lumière.

phosphène induit par une stimulation électrique. Il réussit à faire percevoir des phosphènes [9] à un non-voyant en se servant de la décharge d'un condensateur (Figure 10).

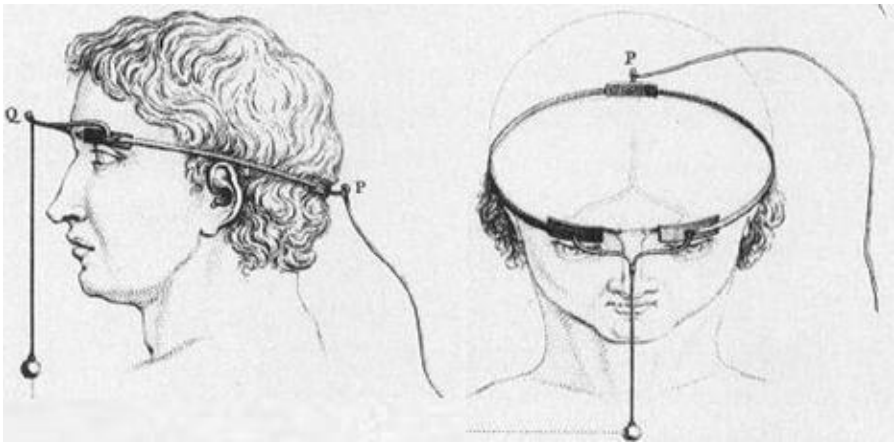


Figure 10 : Expérience de Charles Leroy. Des électrodes sont connectées à une Bouteille de Leyde (ancêtre du condensateur) qui génère les chocs électriques (D'après : Leroy [9]).

1.2.2. La prothèse visuelle électrique : les techniques utilisées.

La technique basée sur une stimulation électrique apparaît comme la méthode la plus proche du fonctionnement naturel de la rétine. Au cours des différentes étapes du traitement de l'information effectué par les couches de la rétine, nous avons vu que l'information lumineuse est transformée en influx nerveux (1.1.1). Dans le cas d'une pathologie qui détruit les photorécepteurs, la transduction n'est plus réalisée et aucune information n'est transmise aux cellules bipolaires et ganglionnaires. Utiliser des impulsions électriques permet de déposer artificiellement des charges et de faire varier localement le potentiel de membrane des cellules présentent dans les couches de neurones encore opérationnelles.

Actuellement, la plupart des équipes qui travaillent à la conception d'une prothèse visuelle ont choisi d'utiliser des réseaux d'électrodes.

Deux ouvrages de J. F. Rizzo de 2008 [10] et M. S. Humayun de 2007 [11] dressent un état des lieux récent des différentes prothèses électriques développées ou déjà en fonction.

Il existe trois lieux principaux de stimulation qui présentent chacun, des avantages et des inconvénients. Tout d'abord, les implants placés au niveau de la rétine qui constituent les dispositifs les plus répandus. Ils se scindent en deux catégories : les implants placés sous la rétine (sub rétiniens) et ceux placés en surface (épi rétinien). Il existe également des prothèses de stimulation du nerf optique et d'autres enfin qui envoient directement les informations sur

les zones corticales dédiées. Dans chaque configuration, le signal de stimulation suit souvent un protocole d'impulsion de courant précis correspondant à une première phase négative de dépolarisation et de réponse cellulaire. La seconde phase correspond à un pulse de courant positif qui empêche l'accumulation de charges déposées au niveau de l'électrode, effet qui serait nocif pour les cellules. Un temps d'attente est fixé entre ces deux phases afin de ne pas interférer avec la réponse biologique de la cellule [12,13]. Dans la partie suivante, une synthèse des dispositifs développés est donnée.

1.2.2.1. Implant sub rétinien.

Ces implants sont constitués d'un réseau d'électrodes se substituant aux photorécepteurs en stimulant la couche de cellules en aval de ceux-ci (Figure 11).

Un implant sous rétinien proposé par l'équipe de E. Zrenner depuis 1997, est constitué d'une matrice de 16 électrodes alimentées par 1000 micros-photodiodes et par une alimentation externe [14]. Malgré des problèmes avec les photodiodes, ces prothèses ont montré que la stimulation sous rétinienne pouvait induire une perception visuelle. Cette technique dont la chirurgie a été validée est en cours d'expérimentation depuis treize ans sur 8 patients. En 2008, sept autres volontaires atteints d'une rétinite pigmentaire ont reçu un nouvel implant à micro-photodiodes couplées à une alimentation externe [15].

L'équipe de D. R. Chow explore également la piste d'implants sous rétiniens à base de photodiodes. Les premiers essais cliniques sur six patients réalisés en 2000 n'ont pas permis une excitation directe de la rétine [16].

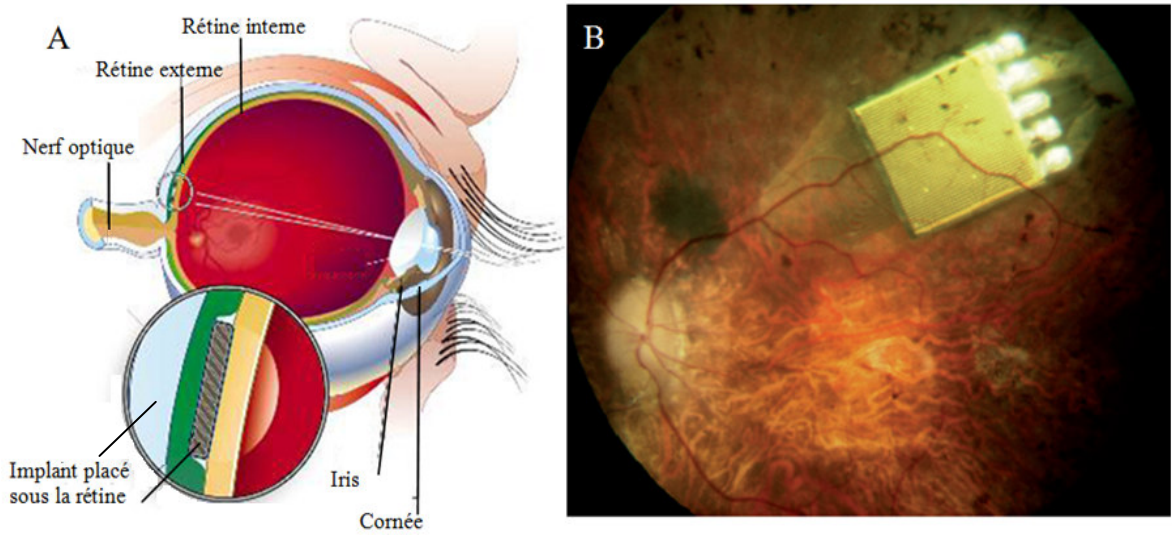


Figure 11 : Représentation d'un implant sous rétinien (A: D'après : Besch [15], B: D'après : Chow [16]).

Cependant, ces recherches ont apporté quelques résultats : elles ont permis d'observer une migration des connexions dendritiques des cellules attirées progressivement par les électrodes, mais aussi un effet de corrosion sur les électrodes implantées. Depuis 2004, de nouveaux essais cliniques sont réalisés sur une trentaine de patients [17].

1.2.2.2. Implant épi rétinien.

Ce type d'implant stimule directement les cellules ganglionnaires (Figure 12).

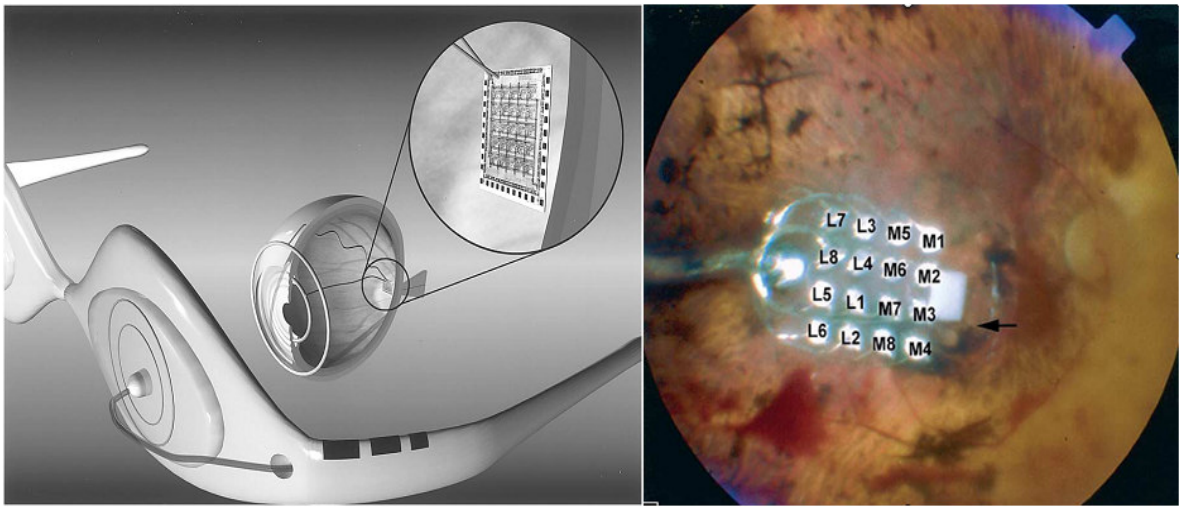


Figure 12 : Représentation d'un implant épi rétinien (D'après : Humayun [12, 18]).

L'approche épi-rétinale est la technique la plus utilisée par de nombreuses équipes de recherche dans le monde, et ce, principalement aux États-Unis [12, 18, 19, 20, 21], en Australie [22], en Allemagne [23] et en France [24]. Tous les dispositifs sont semblables dans le principe : la stimulation est réalisée au niveau des cellules ganglionnaires par un réseau d'électrodes. Une trentaine d'essais cliniques ont été ou sont actuellement en cours. H. S. Humayun et son équipe ont été les précurseurs en implantant 6 patients en 2003 avec une matrice de 16 électrodes (ARGUS 1). Pour cinq d'entre eux, la prothèse a permis de localiser et reconnaître des objets contrastés ou des sources lumineuses. Une prothèse de deuxième génération de 60 électrodes (ARGUS 2) est en phase de test depuis 2007. L'Institut de la Vision, à Paris, fait partie des centres médicaux participant au test de l'implant épi-rétinien ARGUS 2 et au suivi de trois patients implantés. J. Sahel et S. Picaud de l'Institut de la Vision prévoient d'ici 2012 d'augmenter la résolution spatiale de ces électrodes afin d'insérer, sur une surface maximale de 3 à 6 mm², au moins 600 points de stimulation. Ce nombre

correspond au nombre de pixels minimum nécessaire pour la lecture d'un texte [25]. Des études sur l'amélioration de la bio compatibilité de nouveaux matériaux comme le diamant (projet DREAMS) pour la fabrication des électrodes sont également en cours [26, 27].

1.2.2.3. Implant sur le nerf optique.

L'équipe de recherche de l'université de Louvain (Belgique) dirigée par C. Veraart a utilisé un stimulateur composé de quatre électrodes spiralées placées autour du nerf optique qui sont reliées à des sources de courant indépendantes [28, 29, 30]. La transmission des données vers le stimulateur est effectuée par ondes radio. Deux patients sont implantés depuis 1998 et 2000. Les performances en termes de reconnaissance d'objets dépendent du patient. En effet, le temps écoulé depuis la déclaration de la cécité semble être très important. Un autre projet de recherche intitulé « C-Sight: A Novel Approach For Visual Prosthesis » dirigé par Q. Ren propose le développement d'une prothèse visuelle complète basée sur l'implantation d'une caméra à la place du cristallin et d'un système de stimulation qui pénètre directement dans le nerf optique (Figure 13) [31].

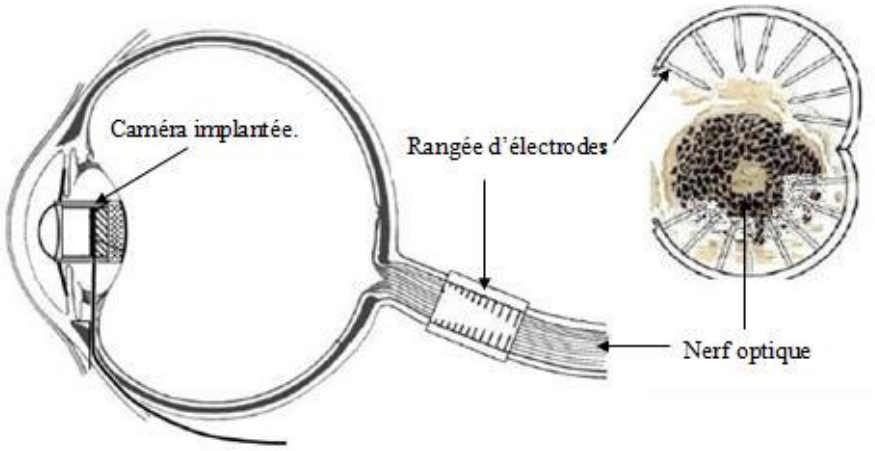


Figure 13 : Représentation d'un implant au niveau du nerf optique (D'après : Chai [31]).

Il s'agit d'une bague dotée de rangée d'électrodes plantée dans le nerf optique. Les premiers résultats montrent que les seuils d'observation des potentiels évoqués sont inférieurs avec leurs implants que ceux obtenus avec une stimulation en surface. Par rapport aux travaux du groupe de C. Verrart, cette technique devrait permettre de générer une densité de phosphènes plus élevée et une information mieux répartie dans le champ visuel.

1.2.2.4. Implant cortical et intra cortical.

Ce type d'implant se présente sous la forme d'une matrice d'électrodes disposée au niveau de l'aire visuelle primaire (Figure 14). Les travaux de l'équipe de W. H. Dobelle ont prouvé que la stimulation du cortex visuel permet l'apparition de phosphènes [32].

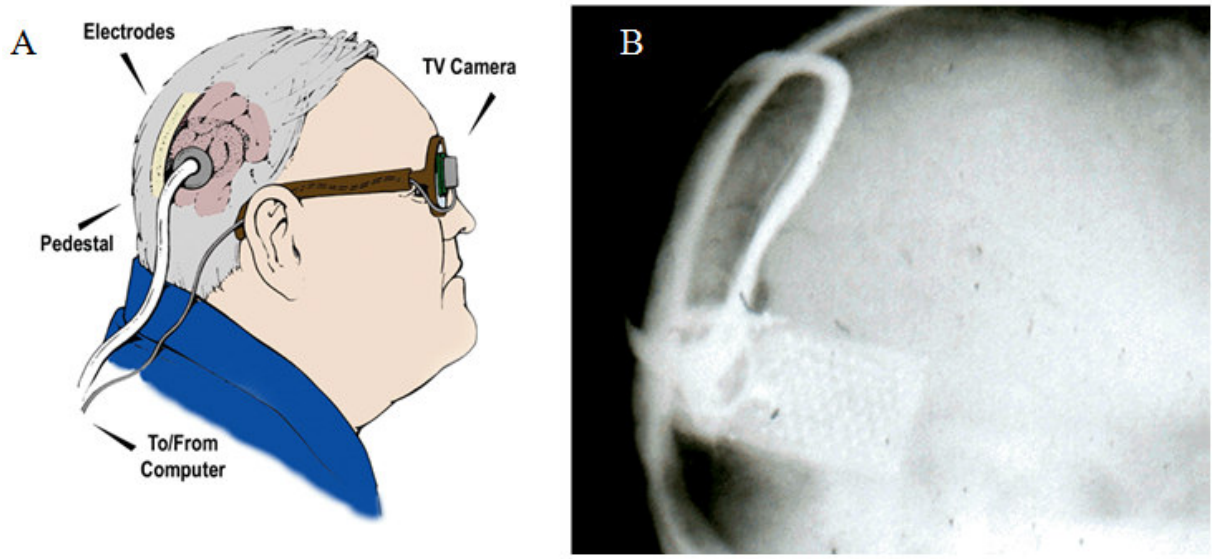


Figure 14 : Représentation d'un implant cortical (D'après : Dobelle [32]).
A : Système de vision artificielle complet. B: Photographie aux rayons X du réseau d'électrodes implanté sur le lobe occipital droit.

Ce dispositif a pour avantage de présenter une solution à toutes les pathologies de la vision touchant les régions se trouvant en amont du cortex visuel, même celles provoquant la destruction du nerf optique. Cette méthode permet également d'obtenir des seuils de stimulation relativement bas, mais elle impose un accès chirurgical risqué qui peut présenter des complications post opératoire importantes. De plus, d'autres problèmes liés à cette technique sont à noter : cette stimulation qui court-circuite le prétraitement rétinien ne permet pas une bonne équivalence entre la position de la zone stimulée et le lieu d'apparition du phosphène dans le champ visuel (rétinotopie). Enfin, ce type de stimulation peut entraîner des crises d'épilepsie [33].

1.2.2.5. Bilan.

Ces dispositifs d'implantation et de stimulation électriques (stimulation corticale, épi rétinienne, sub rétinienne ou du nerf optique) ont permis la génération de sensations lumineuses chez des patients aveugles.

Il est observé que les phosphènes générés ont certaines propriétés qu'il semble possible de paramétrer selon les caractéristiques de la stimulation [19, 34] :

- La taille des phosphènes est proportionnelle au nombre de cellules stimulées,
- La luminosité perçue est proportionnelle à l'intensité de la stimulation,
- Leur position dans le champ visuel peut être contrôlée : en effet, dans le cas de stimulateurs basés sur une matrice d'électrodes, la topographie des fibres nerveuses est telle qu'il est possible de lier les positions des stimulations aux positions induites dans le champ visuel du patient.
- La durée/fréquence d'apparition dépend de l'amplitude et de la durée de la stimulation.

L'utilisation d'un réseau d'électrodes et d'une trame de stimulation rend possible dans certains cas la reconnaissance de formes simples très contrastées et des sources lumineuses [12, 20, 28].

Si ces essais cliniques prouvent qu'il est possible d'induire des sensations lumineuses en utilisant de telles prothèses, ils en montrent aussi les limitations :

- Accès chirurgical difficile et possibilité de dommages causés par le contact physique des électrodes sur les tissus,
- Difficulté à maintenir les électrodes en place à cause des mouvements de saccades oculaires (pour les prothèses épi et sub rétiniennes),
- Dégradation du contact électrode/tissu au cours du temps (effet de corrosion des électrodes et apparition d'une gliose réactionnelle autour de l'électrode), qui nécessite d'utiliser des densités de courant plus élevées,
- Accumulation de charges nocives pour les cellules (malgré un signal biphasé),
- Résolution spatiale limitée par la taille des électrodes. Des électrodes plus petites (quelques dizaines de microns) sont plus sélectives, mais elles nécessitent d'utiliser des densités de courant plus importantes, ce qui entraîne à terme leur dégradation par des mécanismes électrochimiques (corrosion, oxydation). Malgré la recherche de matériaux plus performants sur ce point, et compte tenu des densités de charges devant être déposées, le diamètre des électrodes semble ne pas pouvoir être inférieur à la centaine de microns. Une électrode de cette taille stimule donc un grand nombre de cellules ganglionnaires (la taille du soma d'une cellule ganglionnaire est de l'ordre de la vingtaine de microns).

Actuellement, même si la stimulation électrique est la technique la plus couramment utilisée pour les prothèses visuelles, elle ne permet pas une implantation durable et reste très limitée au niveau de la résolution spatiale et temporelle bien que de nouvelles avancées technologiques soient prévisibles.
Des études ont montrées que l'activité d'une cellule peut aussi être contrôlée en utilisant une stimulation magnétique [35], mécanique [36], chimique [37] ou optique [38]. C'est cette dernière technique de stimulation que nous avons choisi d'utiliser.

1.3. Stimulation laser de tissus neuronaux.

Cette partie débute par des exemples de l'utilisation de lasers dans le domaine ophtalmologique et se poursuit par un bilan des différentes recherches et des résultats obtenus par les équipes travaillant sur la stimulation optique et notamment laser, de tissus neuronaux (hors photorécepteurs).

Dans le cadre du projet de stimulateur rétinien, les avantages attendus de cette technique sont :

- Stimulation sans contact, donc moins traumatisante pour le tissu.
- Meilleure résolution spatiale (taille du spot minimum de l'ordre de la longueur d'onde).
- Les dimensions actuelles des lasers à semi-conducteurs permettent d'envisager des dispositifs de stimulation très compacts pouvant être implantés par exemple à la place du cristallin.

1.3.1. Utilisations des lasers en ophtalmologie.

Les caractéristiques des lasers en font des instruments de grande précision spatiale pour de nombreuses applications dans le domaine médical notamment en ophtalmologie. La taille de leur faisceau permet de traiter à distance une zone réduite ciblée sans détériorer les tissus sains proches. La plupart des interventions sont indolores, très rapides (moins de trente minutes) et les temps de récupération visuelle sont rapides.

Leur utilisation permet de corriger certains troubles oculaires tels que la myopie, l'hypermétropie, l'astigmatisme [40, 41]. Ils permettent aussi de traiter certaines pathologies rétiniennes telles que, entre autres, la cataracte, le glaucome, l'hypertension oculaire et comme traitement préventif au décollement de la rétine [43].
Le large choix de lasers disponibles permet, une fois la nature exacte du trouble visuel identifiée, l'application du traitement adapté.
Il existe différents types de lasers utilisés en ophtalmologie :

- le laser Argon ($\lambda \approx$ autour de 450 nm) : Il est utilisé pour la prévention du décollement de la rétine, de la dégénérescence maculaire et du glaucome. Il permet de provoquer de petites brûlures très localisées en employant le principe de la photocoagulation.

- le laser Néodyme : Nd-YAG ($\lambda \approx 1064$ nm) : Après une opération de la cataracte, il permet de lutter contre les opacifications secondaires. Ce laser qui peut fonctionner à des fréquences élevées (10^{12} Hz) produit également un effet mécanique permettant de découper des tissus tel un bistouri de très haute précision sans dégagement de chaleur.

- le laser à Excimer ($\lambda \approx 193$ nm): Il s'agit d'un type de laser ultraviolet utilisé essentiellement dans les pathologies ophtalmiques et plus particulièrement dans le traitement de la myopie (remodelage de la cornée par photo-ablation).

Ces exemples d'utilisation de lasers en ophtalmologie démontrent le large champ d'application possible avec ce type de source lumineuse. Dans les applications citées ci-dessus les lasers sont utilisés comme instrument chirurgical ou thérapeutique.
La partie suivante traite d'une application permettant de stimuler le tissu nerveux par l'application d'un laser.

1.3.2. Stimulation laser de neurones.

Dans le cas de pathologies rétiniennes qui provoquent la destruction des photorécepteurs, deux stratégies sont actuellement développées afin de rendre possible l'utilisation de l'énergie lumineuse pour stimuler les neurones encore fonctionnels. La première consiste à rendre les cellules sensibles à une lumière spécifique. La deuxième correspond à la recherche d'une stimulation lumineuse permettant l'excitation des neurones non modifiés.

1.3.2.1. Cellule rendue photosensible.

Une piste récente est celle qui permettrait de redonner sa fonction de transduction à la rétine, même lorsque ses photorécepteurs naturels ne fonctionnent plus. Excepté les photorécepteurs et 1 % de cellules (ipCGRs) localisées dans la couche des cellules ganglionnaires[10] [42], les neurones ne possèdent pas la capacité de capter la lumière pour la transformer en signal électrique.
Différentes stratégies ont été développées pour rendre les cellules photosensibles [43,44] :

- Par génie génétique, en faisant apparaître une protéine canal photosensible [45, 46, 47],
- Par génie génétique, en modifiant un canal ionique naturellement existant en le rendant photosensible [49],
- En contrôlant l'activité synaptique par photo-décageage de neurotransmetteurs emprisonnés [48]

La première méthode, la plus récente, est l'introduction dans une cellule rétinienne d'un gène d'algue bleue codant pour la fabrication d'un canal membranaire photosensible.
Il est même possible de générer deux types de canaux, un responsable de l'excitation et un autre inhibiteur [50]. L'équipe de X. Han a ainsi montré que l'utilisation de nouveaux types de canaux ioniques de types K+ tels que la Channelrhodopsin-2 (ChR2) et l'halorhodopsin (Halo) rendent la cellule sensible à la lumière bleue ou à une lumière jaune (Figure 15).

[10] Cellules qui semblent impliquées dans la régulation du cycle circadien (variation jour / nuit).

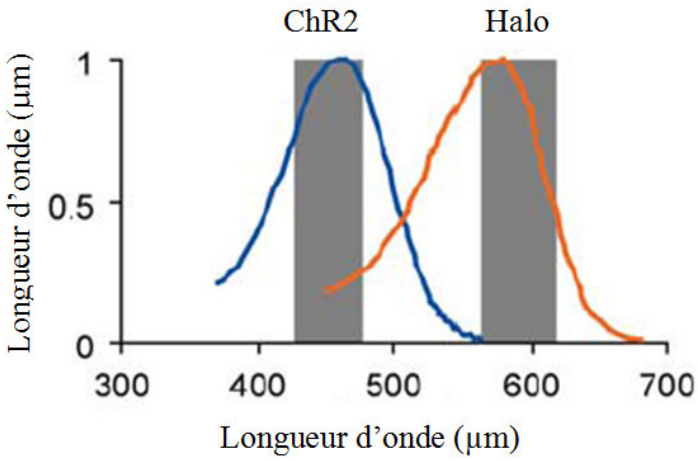


Figure 15 : Spectre d'absorption normalisé pour la Channelrhodopsin-2 et l'halorhodopsin (D'après : X. Han [56]).

La spécificité des échanges ioniques permis par ces nouveaux canaux semble exciter la cellule quand elle est éclairée par une lumière bleue alors que la lumière jaune a une fonction inhibitrice. Ces travaux font l'objet d'une étude dans le cadre d'une prothèse visuelle [51].

La deuxième technique consiste à modifier génétiquement un canal membranaire en le liant de façon covalente à une molécule photo-isomérisable. En fonction de sa conformation, la molécule va boucher le pore ou non, et permettre ainsi de contrôler le flux d'ions à travers ce canal.

Enfin, la troisième stratégie, uniquement utilisée in vitro, vise à simuler une excitation synaptique en augmentant localement la concentration en neurotransmetteur. Pour cela, le tissu est perfusé par une solution riche en molécules de neurotransmetteur rendues inactives par la liaison covalente avec une autre molécule. Un faisceau laser peut casser cette liaison covalente et ainsi augmenter localement la concentration en neurotransmetteur actif. Dans une étude datant de 2008, une stimulation laser dans l'UV a été réalisée sur des cellules de l'hippocampe traitées avec du glutamate emprisonné [48]. Ces cellules sont mises en culture sur une bio-puce contenant un réseau de 60 microélectrodes. Un faisceau laser focalisée dans une fibre monomode d'un diamètre de cœur de 2 µm et procurant une puissance optique de 1 mW en sortie a été utilisé. Cette étude démontre la possibilité d'utiliser une diode laser UV pour la stimulation des neurones. L'utilisation d'une fibre optique permet des stimulations très localisées au plus près d'une électrode de mesure. Cette stimulation couplée à une technologie à base de bio-puce devrait permettre l'étude de la contribution des différentes régions sur le comportement de l'ensemble du réseau neuronal.

1.3.2.2. Excitation optique de neurone non traité.

Sans traitement spécifique, les cellules de la rétine (excepté les photorécepteurs) n'absorbent pas la lumière naturelle comprise dans la gamme de longueur d'onde allant du visible au proche infrarouge (de 400nm à 1400nm). A l'exception de quelques cellules ganglionnaires comme on l'a vu dans le paragraphe précédent, elles ne sont donc pas excitées par cette lumière. En revanche, certaines longueurs d'ondes appartenant à des domaines telles que l'Ultraviolet (UV) ou l'infra Rouge (IR) possèdent une absorption d'énergie suffisante (Tableau 1).

Auteurs	λ (µm)	Coefficient d'absorption dans l'eau (cm^{-1})	Diamètre de fibre optique (µm)	Distance entre fibre et tissu (µm)	Seuil d'excitation (J/cm^2 ou mW)	Temps de stimulation (s)	Élévation en température (°C)
S. Liang [66]	980	0,48	10	-	13 mW < Popt < 73 mW	$500\ 10^{-6}$	5 < T < 14
R. G. Mc.Caughey [62]	1,45 1,495* 1540	32 22,8 12,6	1000 28 1000	2000	35 ± 11 J/cm^2 3,7 ± 28 et 4,9 ± 1,6 J/cm^2 8,9 ± 2,2 J/cm^2	$100,10^{-3}$ 2 et 25 10^{-3} $200\ 10^{-3}$	- 13 -
A.D.Izzo [65]	1,855	11,5	200	500	0,005 ± 0,6 J/cm^2 à 0,0583 ± 4,5 J/cm^2	$35,10^{-6}$ à $1,10^{-3}$	0,3< T < 0,4
A.D.Izzo [59]	1,94	136	200	coller	0,005 J/cm^2	$100,10^{-3}$	0,15
R. G. Mc.Caughey [62]	2,1	28,7	600	2000	0,45 ± 0,05 J/cm^2	$300,10^{-6}$	-
J.Wells [63]	2,12	26,5	600	750	0,4 à 0,8 J/cm^2	$350,10^{-6}$	8,95
A.D.Izzo [59]	2,12	26,5	100	300	0,018 à 3 J/cm^2	$250,\ 10^{-6}$	-
A,D,Izzo [60]	2,12	26,5	600	coller	0,88 et 1,77 J/cm^2	$250,\ 10^{-6}$	-

Tableau 1 : Aperçu global des longueurs d'onde permettant une stimulation de tissus neuronaux. (* : Taille du spot de 400 µm et 900 µm au niveau du tissu).

En 1971, R. L. Fork stimula de façon sélective les neurones ganglionnaires abdominaux d'un mollusque marin avec un laser visible de 488 nm [52]. Dans cette étude pionnière, la stimulation optique entraîne une dépolarisation réversible de la cellule sans

dommage. Bien que le mécanisme de la dépolarisation n'ait pas été caractérisé, les temps de stimulation de l'ordre de la minute nécessaire à l'excitation de la cellule pourraient indiquer un mécanisme photochimique. A. B. Uzdensky avec un laser émettant dans le bleu (λ = 441.6 nm, P_{opt} = 120 mW) [38] et P. Balaban avec un laser rouge (λ = 632,8 nm, P_{opt} = 10 mW) obtiennent des réponses de neurones [53]. Ces longueur d'onde semblent avoir un effet inhibiteur marqué par l'absence de potentiels d'action (laser bleu) ou un effet excitateur après un temps de latence allant de 11 sec à 28 secondes suivant l'énergie reçue par la cellule.
L'utilisation d'une longueur d'onde appartenant au spectre visible permet d'obtenir une réponse cellulaire avec des temps de stimulation et temps de latence très importants.

En 1994, l'excitation de fibre nerveuse du rat par un laser excimer (UV) picoseconde fibré a été prouvée [54]. La stimulation laser a engendré une réponse évoquée au niveau du cerveau qui correspondait parfaitement à une réponse induite par une stimulation électrique. Néanmoins, le seuil d'excitation de 0,9 J/cm^2 étant très proche du seuil de photoablation UV (de l'ordre de 1 J/cm^2), les fibres nerveuses présentaient des dommages irréversibles.
Depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'utilisation de laser émettant dans le domaine de l'infrarouge. En 2002, la faisabilité d'une excitation de cellules du cortex visuel de la souris par un laser pulsé Ti:sapphire (790–850 nm), émettant dans le proche infrarouge a été prouvée [55]. Deux effets sont observés : pour des temps d'exposition long à des intensités faibles, un effet photochimique peut être créé par l'absorption de la lumière par des chromophores intrinsèques à la cellule. Pour des impulsions de courte durée et de forte intensité (mode biphoton) la réponse est rapide et il s'agit peut être d'un effet mécanique de création de micro-perforations de la membrane cellulaire.

En 2005, l'équipe d'E. D. Jansen a fait la démonstration d'une stimulation du nerf sciatique par un laser infrarouge pulsé et fibré de type HO:YAG à 2.1 µm en enregistrant les contractions des muscles du rat [56] et de la grenouille [57]. L'équipe de J. T. Walsh a montré la stimulation du nerf facial [58] et des cellules de l'appareil auditif de la gerbille [59, 60, 61]. En 2009, R. G. Mc Caughey a obtenu des réponses musculaires en excitant le nerf sciatique du rat avec des valeurs de longueurs d'ondes comprise entre 1450 nm et 1540 nm [62]. Ces études ont permis d'identifier les longueurs d'onde les plus efficaces pour la stimulation en établissant un rapport direct avec le coefficient d'absorption de l'eau [56]. Des seuils énergétiques d'excitation et de destruction spécifiques à chaque tissu neuronal testé ont été identifiés avec précision [56, 59 62, 63]. Les réactions biologiques obtenues au cours de différentes excitations laser montrent l'importance du choix des paramètres de stimulation tels que la durée et l'amplitude de stimulation [56, 59, 64, 65]. Si les mécanismes physiques et

biologiques expliquant l'interaction du laser sur le tissu ne sont pas totalement confirmés, l'hypothèse privilégiée par les équipes de recherche est un effet thermique par absorption du faisceau laser par les molécules d'eau [57]. Dans le paragraphe suivant, nous allons détailler les paramètres principaux de la stimulation laser IR à partir des recherches menées par les groupes de Jansen, Walsh et McCaughey.

a. Critère de sélection de la longueur d'onde.

La gamme de tests réalisés s'est échelonnée pour des longueurs d'ondes comprises entre 1,450 µm et 10 µm. Chacune d'elle a permis d'observer une réponse biologique de type musculaire ou nerveuse suivant le tissu visé [56, 57, 58, 60, 62]. Néanmoins, il est à noter qu'à certaines longueurs d'onde, le seuil à atteindre pour exciter le nerf est identique ou très proche du seuil de destruction locale du tissu. Certains auteurs ont défini un « rapport de sécurité » établi entre les seuils d'excitation et le seuil de destruction du tissu nerveux, qui est comparé à l'évolution du coefficient d'absorption de l'eau pour la longueur d'onde employée (Figure 16).

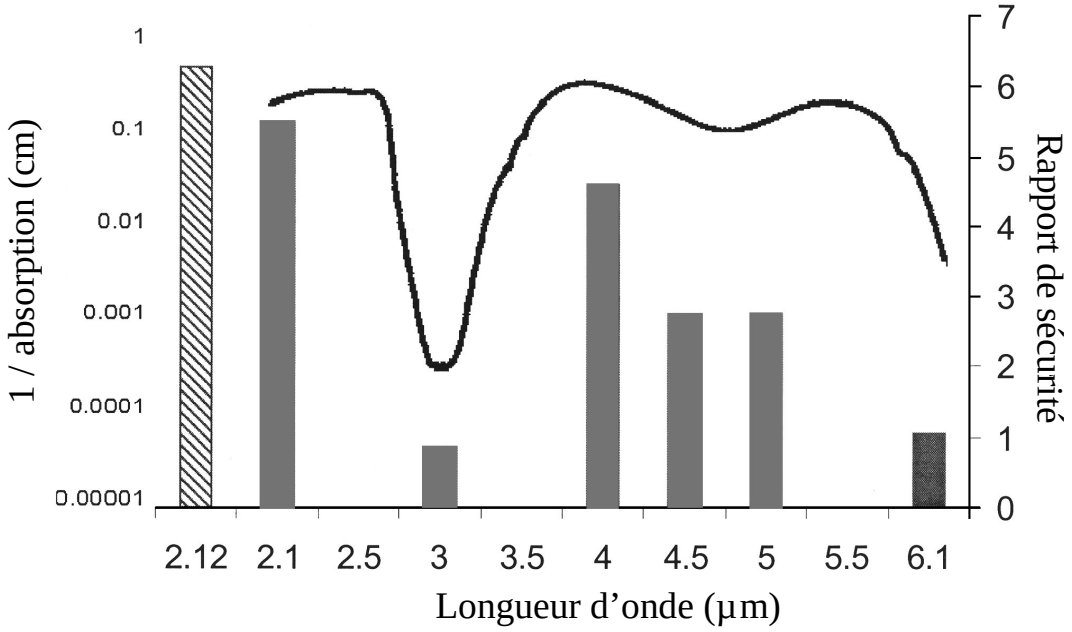


Figure 16 : Comparaison du coefficient « rapport de sécurité » et de l'absorption dans l'eau an fonction de la longueur d'onde (D'après : Wells [56]).

Le choix du laser dépend du spectre d'absorption dans le liquide et les longueurs d'onde employées. Ainsi, une stimulation optimale ne se produira pas pour des longueurs d'onde correspondant aux pics d'absorption du liquide, car les seuils de stimulation se situent trop

près des seuils de dommages cellulaires. Les longueurs d'onde de 2,1 µm et 4 µm apparaissent sur la figure comme les plus adaptés pour la stimulation. D'autres études effectuées avec des longueurs d'ondes différentes de 2,1 et 4 µm présentent les mêmes caractéristiques. Le choix de ces longueurs d'onde est effectué en fonction de la valeur de leurs coefficients d'absorption dans l'eau. Ainsi, des lasers de 1,45 µm et 1,87 µm sont utilisés car ils présentent un coefficient d'absorption similaire a celui des lasers de 2,1 et 4 µm alors que le laser à 1,93 µm permet lui, de tester l'efficacité d'un laser possédant une valeur de coefficient d'absorption supérieur [56, 60, 62,].

b. Seuil d'énergie de la stimulation.

A l'étude des différents résultats, il apparaît que la valeur seuil de l'énergie de stimulation requise pour la stimulation est identique avec les trois longueurs d'ondes testées. En effet, les coefficients d'absorption dans l'eau de chaque longueur d'onde étant très proche, le seuil d'énergie reste stable dans les trois cas. L'énergie déposée est fixée en faisant varier les temps de stimulation de manière à obtenir le même dépôt d'énergie pour chaque longueur d'onde utilisée (Figure 17). Les tests menés sur le nerf sciatique du rat donnent des seuils de stimulation (calculés en sortie de fibre), compris entre 0,34 et 0,48 J/cm^2 pour trois longueurs d'onde testées [57]. De plus, il semble qu'une application prolongée d'énergie comprise entre 0,4 et 0,8 J/cm^2 ne présente pas de risque de dommage.

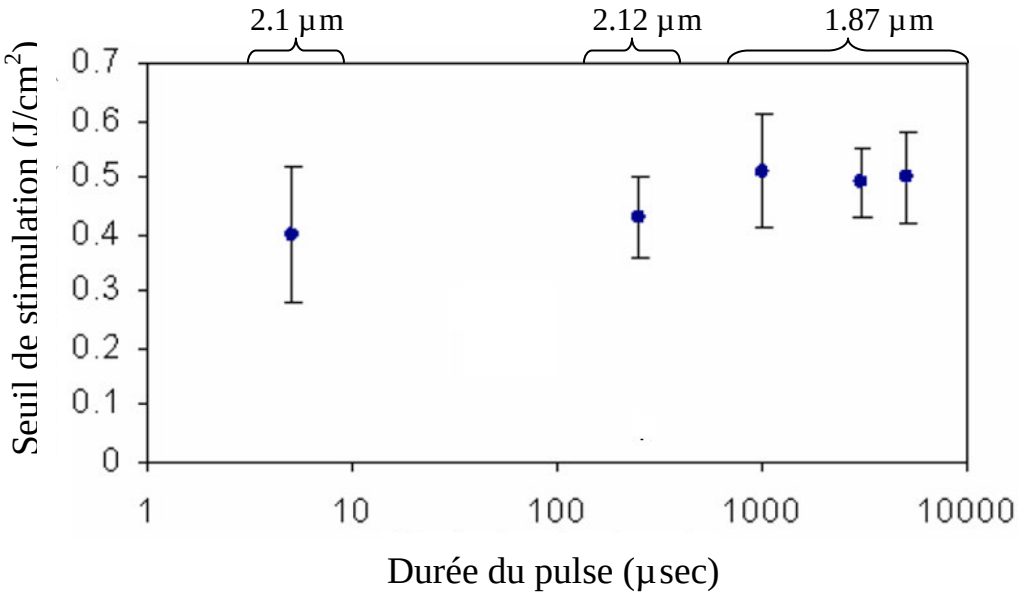


Figure 17 : Seuils de stimulation en fonction de la durée du pulse pour trois longueurs d'onde différentes (D'après : Wells [57]).

Des tests supplémentaires réalisés à température contrôlé sur le nerf sciatique de grenouille ont démontré qu'une variation de la température ambiante ne modifiait pas le seuil d'excitation. Les tests réalisés à 0°C et 25°C avec un laser fibré de 1,87 µm ont donné respectivement des seuils de 0,84 J/cm² et 0,86 J/cm² [64]. Les tests réalisés sur le nerf facial de la gerbille avec un laser fibré de 2,12 µm ont permis d'enregistrer des réponses musculaires pour des seuils d'exposition compris entre 0,88 et 1,77 J/cm² [58].

Ces résultats concernent exclusivement la stimulation de fibres sensorielles et motrices de différents nerfs entourés de leur gaine collagène. On remarque que les seuils de stimulation peuvent être considérés de valeurs égales et ce, malgré les différences expérimentales concernant la différence du diamètre de la fibre optique utilisé et son positionnement par rapport au nerf.

D'autres tests ont été réalisés par l'équipe de Jansen à des longueurs d'onde identiques non pas sur un nerf, mais sur un système sensoriel neuronal auditif afin d'obtenir des potentiels d'action par stimulation optique [59]. La cochlée de gerbille vivante soumise à une stimulation laser de longueur d'onde de 2,12 µm présente un seuil d'énergie de stimulation stable de $18.10^{-3} \pm 3.10^{-3}$ J/cm². Des tests supplémentaires réalisés à 1,85, 1,937 et 1,94 µm donnent respectivement des seuils de $58{,}3.10^{-3} \pm 4{,}5.10^{-3}$ J/cm² sur des animaux rendus sourds définitivement, 5.10^{-3} J/cm² pour ceux rendus sourds temporairement et $4{,}1.10^{-3} \pm 0{,}4.10^{-3}$ J/cm² pour les animaux sains. Nous remarquons une homogénéité d'ordre de grandeur des seuils d'énergie permettant l'obtention des potentiels acoustiques moyens (50 µV) mesurés au niveau du nerf auditif chez un animal sain ou rendu sourd.

Il apparaît un rapport de 100 entre les énergies seuils utilisées pour l'appareil auditif et celles des nerfs sciatique ou facial.

c. Impacts des paramètres d'expérimentation et de stimulation.

Ces équipes ont également réalisé des tests portant sur l'impact des paramètres de stimulation sur les réponses biologiques obtenues [57, 58, 59, 62, 64, 65]. Les réponses biologiques ont été enregistrées en faisant varier l'énergie de stimulation, la longueur d'onde, le temps de stimulation et la distance de la fibre optique.

- Impact de l'énergie de stimulation.

Une étude a été menée sur l'organe auditif [60]. Les réponses en amplitude de 10µV au minimum sont enregistrées au niveau du nerf auditif au cours de la stimulation optique de la cochlée à des énergies sélectionnable de 0,004 à 100 J/cm².
Les mesures montrent une augmentation de l'amplitude des potentiels acoustiques enregistrés proportionnelle à l'augmentation de l'énergie de stimulation (Figure 18).

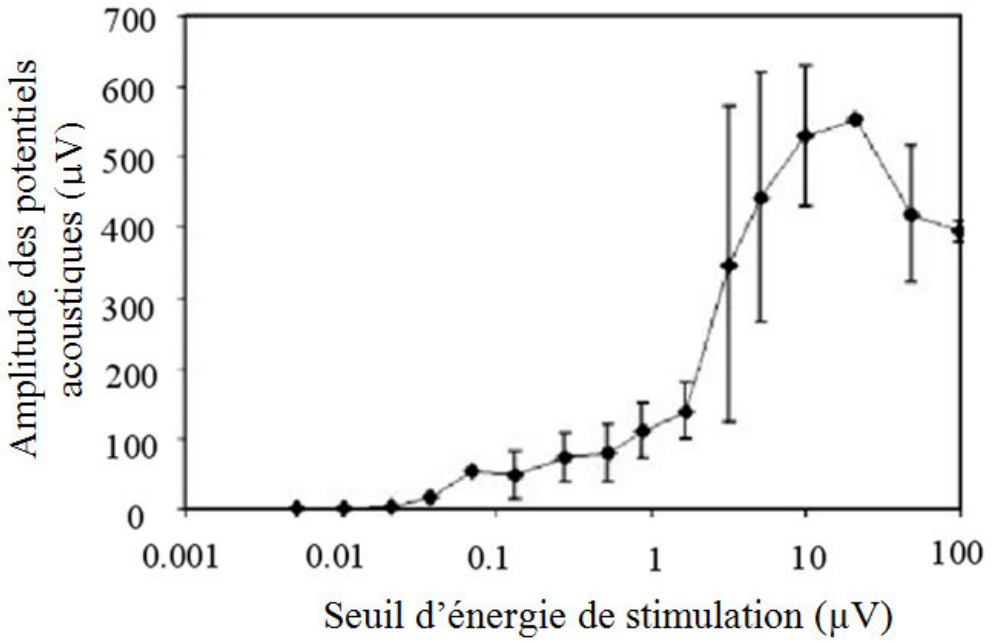


Figure 18 : Amplitude des potentiels acoustiques en fonction de l'énergie de stimulation pour λ = 2,12 µm (D'après : Izzo [60]).

Cependant, au-delà de 3 J/cm², une très grande augmentation de l'amplitude peut être observée avec une incertitude de l'ordre de 50 %. Un autre seuil est atteint vers 20 J/cm² ou une diminution de l'amplitude marque l'apparition de dommages au niveau du tissu visé. Le seuil d'énergie de stimulation de l'ordre de $18.10^{-3} \pm 3.10^{-3}$ J/cm² est proche du seuil d'énergie minimum de stimulation et celui-ci a été retenu par les auteurs.
Faire varier l'énergie de stimulation permet un contrôle sur l'amplitude des réponses.

- Effet de la longueur d'onde.

Des tests ont été réalisés avec deux diodes lasers de longueur d'onde variable suivant la dérive en température du composant. L'une comprise entre 1,844 et 1,873 µm et l'autre comprise entre 1,92 et 1,94 µm (Figure 19). Le temps de stimulation est maintenu à une valeur constante de 35 µs [59,65].

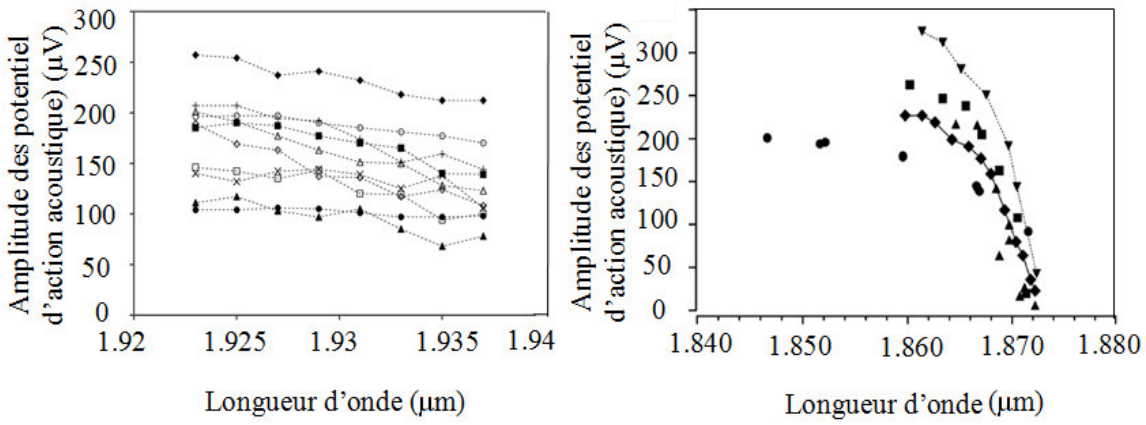


Figure 19 : Réponse neuronale en fonction de la variation de la longueur d'onde.
Chaque type de symbole correspond à une série de mesure effectuée sur un animal différent.
(D'après : Izzo [59,65]).

Ces études mettent en évidence l'impact d'une variation de la longueur d'onde sur les réponses neuronales. Les variations d'amplitude enregistrées sont dues aux valeurs du coefficient d'absorption du liquide aux différentes longueurs d'onde employées. Ainsi, la faible différence d'amplitude observée pour $1,92 < \lambda < 1,94$ µm correspond à une variation de l'absorption inférieure à 1% (83,9 cm^{-1} < coefficient d'absorption < 82,24 cm^{-1}). Au contraire, la grande différence d'amplitude obtenue pour $1,844 < \lambda < 1,873$ correspond à une variation de l'absorption de 26 % (9,91 cm^{-1} < coefficient d'absorption < 21,54 cm^{-1}). Les auteurs expliquent cette diminution de l'amplitude des potentiels acoustiques pour les cas de forte absorption par une diminution de l'énergie absolue arrivant à la cellule.
Il apparaît clairement qu'il est important d'identifier la gamme de longueur d'onde délivrée par les lasers utilisés pour paramétrer correctement la stimulation. Il semble qu'il n'y est pas une longueur d'onde préférentielle à l'obtention de réponse cellulaire pour peu qu'on ne prenne pas un coefficient d'absorption trop important. La gamme efficace et sécuritaire de coefficient d'absorption semble ce situé entre 10 et 100 cm-1. Au delà, les seuils de stimulation correspondent au limite de destruction cellulaire.

- Impact de la durée de l'impulsion de stimulation.

Différents tests ont été menés à des longueurs d'ondes différentes allant de 1.844 µm à 1,94 µm [59, 61, 65]. Un de ces tests a consisté à varier le temps de stimulation entre 35 µs et 1 ms correspondant à des densités d'énergie comprises entre 1 et 10 mJ/cm^2. Ces tests ont été réalisés sur la cochlée d'animaux soit sains, soit rendus sourds temporairement ou définitivement (Figure 20). Les seuils d'énergie validés correspondent à des potentiels acoustiques de 50 µV.

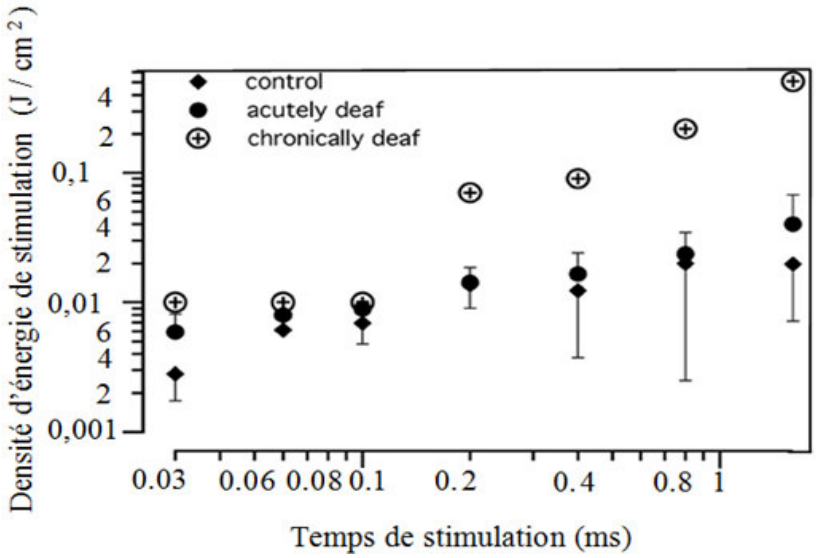


Figure 20 : Seuil de stimulation en énergie pour différents temps de stimulation pour une longueur d'onde non précisée mais comprise entre 1,884 et 1,940 µm (D'après : Richter [61]).

L'étude sur la variation de la durée de l'impulsion montre que plus le temps de stimulation augmente, plus le seuil d'énergie nécessaire à l'excitation devient important pour des temps supérieurs à 100 µs surtout dans le cas d'un animal atteint de surdité définitive. Les autres tests réalisés à différentes longueurs d'onde ont permis d'observer les mêmes types de caractéristiques [59, 65]. Ces tests montrent qu'en cas d'une stimulation continue de plusieurs heures, aucun dommage n'est enregistré pour des temps de stimulation inférieurs ou égaux à 100 µs. L'impact d'une stimulation prolongée (fréquence de 13Hz) de 6 heures à une densité d'énergie de 10 mJ/cm^2, ne fait écho d'aucun dommage observé et montre une stabilité de la réponse neuronale.

- La distance entre l'extrémité de la fibre et la cible.

Il semble que la distance entre la fibre et la zone visée ait un impact sur l'amplitude des potentiels. Plus la fibre est éloignée, plus l'amplitude diminue. Il existe deux raisons à ce phénomène. L'une correspond directement à l'absorption de la lumière proportionnelle à la quantité de liquide se trouvant entre la fibre et la cible. La seconde est due à la taille de la surface éclairée. Plus la fibre est éloignée, plus l'énergie est répartie sur une large surface, du fait de la divergence du faisceau en sortie de fibre. Pour compenser cet effet, il suffit d'augmenter la puissance du laser proportionnellement à la baisse d'amplitude observée. Cette augmentation de puissance doit tenir compte du coefficient d'absorption du liquide à la longueur d'onde employée et de la densité d'énergie surfacique souhaitée [56].

Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre les principes physiologiques de la vision et les principaux types de pathologies qui touchent les photorécepteurs de la rétine. Une étude des travaux sur les prothèses visuelles actuellement en cours nous a permis de voir les avancées et les limites biologiques et technologiques auxquelles sont confrontés actuellement de tels dispositifs.

Dans notre cas, nous avons choisi de travailler sur la stimulation de neurone de la rétine par voie optique. Dans le cadre d'une prothèse visuelle, les avantages attendus d'une telle stimulation sont :

- Stimulation sans contact, donc moins traumatisante pour le tissu,
- Meilleure résolution spatiale,
- Compacité des dispositifs à diode laser, facilitant l'implantation chirurgicale.

La dernière partie de ce chapitre a enfin fait le bilan des travaux en cours basés sur ce type de stimulation sur des tissus neuronaux. Nous avons détaillé les caractéristiques à prendre en considération au cours d'une telle stimulation, notamment au niveau des seuils d'énergie et des temps de stimulation. Les auteurs de ces études ont ainsi pointé la relation liant seuil non destructif de stimulation avec les valeurs du coefficient d'absorption de l'eau dépendant de la longueur d'onde de stimulation.

Enfin, même si la presque totalité des résultats de stimulation laser de neurones dont les résultats ont été publiés concerne des animaux vivants et sur des neurones autres que ceux de la rétine, ces études nous ont fourni une base de départ indispensable lors de la conception de notre banc de stimulation optique IR qui est présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 : Mise en œuvre des bancs d’expérimentation de stimulation et de mesures.

Introduction

Ce chapitre est consacré à l'ensemble du travail réalisé pour la conception des différents bancs de stimulation.

La première partie commence par détailler les différents modèles biologiques qui ont été choisis pour les tests in-vitro : les cultures cellulaires et les tranches de rétine. Nous verrons les raisons qui nous ont conduit à choisir un modèle de souris pour nos tests et nous détaillerons les avantages de réaliser également des tests sur des cellules vestibulaires du rat.

Nous présentons ensuite les trois techniques de mesures de signaux biologiques mis à notre disposition par l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM) : deux bancs de mesures in-vitro d'échanges ioniques transmembranaires (mesures électrophysiologiques par la technique de patch clamp et par microscopie de fluorescence biphotonique) et un banc de mesure in-vivo de potentiels évoqués (mesures électro-encéphalographiques). Cette prise de connaissance du fonctionnement des bancs de mesures et des phénomènes biologiques qu'ils permettent d'observer, représente une étape nécessaire au travail d'adaptation de notre stimulateur.

La dernière partie présente l'un des objectifs majeurs de ma thèse consistant à concevoir un banc de stimulation laser compatible avec les techniques de mesures utilisées. Nous présentons tout d'abord en détail la partie conception en expliquant le choix des longueurs d'onde des lasers et les différentes mesures de caractérisation réalisées. Nous détaillons le matériel choisi permettant de réaliser la commande des signaux de stimulations et l'enregistrement des différents signaux biologiques. Nous verrons comment ces différentes fonctions réalisées par le banc de stimulation sont gérées par un programme réalisé avec le logiciel LabVIEW. Finalement, nous décrivons les stratégies qui ont été adoptées pour réaliser le travail d'adaptation du banc de stimulation optique sur les bancs de mesure in vitro et in vivo.

2.1. Choix des modèles animaux et biologiques.

2.1.1. Modèle animal.

Au départ du projet, la décision du choix du modèle animal à utiliser pour nos tests a été prise en considérant les échéances immédiates et les étapes futures du projet. En effet, le modèle choisi devait être disponible à l'animalerie de l'INM, et il devait pouvoir servir autant au cours de tests in vitro que des tests in vivo.

Le lapin possède un œil de grande taille qui permet une manipulation et une visibilité confortable au cours de test in vivo. Malheureusement, il possède des axones myélinisés qui font de lui un modèle trop éloigné de la configuration observée chez l'homme. Le choix a donc dû être fait entre le rat et la souris. Ces deux modèles, contrairement au lapin, mais comme chez l'homme, possèdent des axones recouverts par une gaine de myéline qui n'apparaît qu'au niveau de la papille optique. Dans les deux cas, nous ajoutions de la difficulté pour la mise en place des tests in vivo de par la faible taille des globes oculaires de chacun. Finalement, le choix s'est porté sur la souris, car elle offre la possibilité d'utiliser un modèle pathologique (rd 10) présentant une mutation spontanée dans le gène Rod-PDE [66]. Cette mutation conduit à une dégénérescence sélective des photorécepteurs à partir du 18ème jour post natal (Figure 1). Si les résultats présentés dans la thèse ont tous été obtenus chez un animal sain, le choix d'un tel animal permettra ensuite à la suite du projet à s'intéresser à un modèle pathologique montrant de nombreuses similitudes avec les déficiences rencontrées chez les patients.

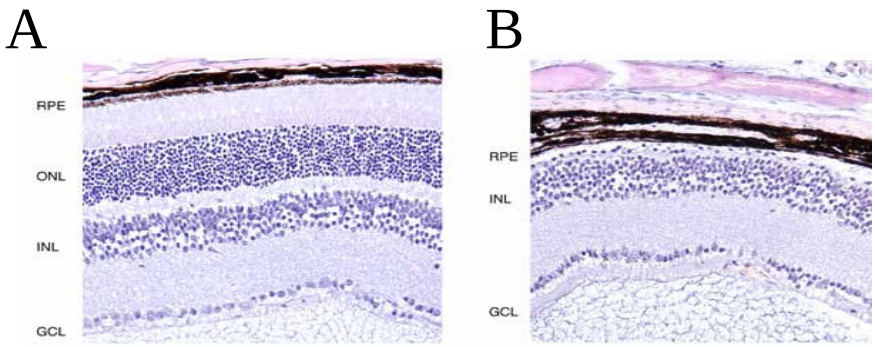


Figure 1 : Coupe d'une rétine du modèle de souris RD10 : *A : A la naissance ; B : 1 mois après.*

Comme on peut le voir sur l'image de la figure 1, chez la souris âgée de 1 mois, les couches des cellules ganglionnaires (GCL) et de la rétine interne (INL) sont préservées alors

que les photorécepteurs (ONL) sont complètement absents. Ce modèle constitue donc un modèle de choix dans le projet à plus long terme de développement d'une prothèse visuelle. Le modèle animal du rat qui n'a pas été retenu pour les tests sur la rétine, a été utilisé au cours de nos expériences. Cette stratégie est expliquée par la suite.

2.1.2. Modèle biologique.

Au cours de ma thèse, différents tests ont été réalisés sur plusieurs supports biologiques. Leurs préparations ont été réalisées par Mlle Sandrine Emmanuelle Albert, doctorante de l'INM dont la thèse (soutenance prévue début 2011) vise à expliquer les mécanismes cellulaires responsables de la réponse de la cellule au cours d'une stimulation optique. Nos sujets de thèse sont ainsi interdépendants et complémentaires.

Les tests in vitro ont commencé avec le modèle des tranches de rétine qui s'est avéré être difficilement exploitable pour nos travaux de mise au point de mesure. Une solution alternative nous a été proposée par l'INM en utilisant deux modèles de culture cellulaire : l'une, de cellule ganglionnaire de la rétine de souris et une autre de cellule ganglionnaire vestibulaire de rat, cette dernière culture étant déjà très bien maîtrisée à l'INM. Dans cette partie, l'explication des choix de ces différents modèles est détaillée.

2.1.2.1. Tranche de rétine.

Le modèle de tranche de rétine a été choisi initialement, car il représente le meilleur compromis entre l'in vitro et l'in vivo. Il permet d'effectuer des tests pharmacologiques indispensables et uniquement réalisables en configuration in vitro. Il est ainsi possible de l'utiliser en électrophysiologie ou en imagerie de fluorescence. L'avantage de ce modèle est qu'il permet de maintenir les cellules dans leur environnement naturel en gardant intactes les connexions entre les différentes cellules des couches de la rétine (Figure 2).

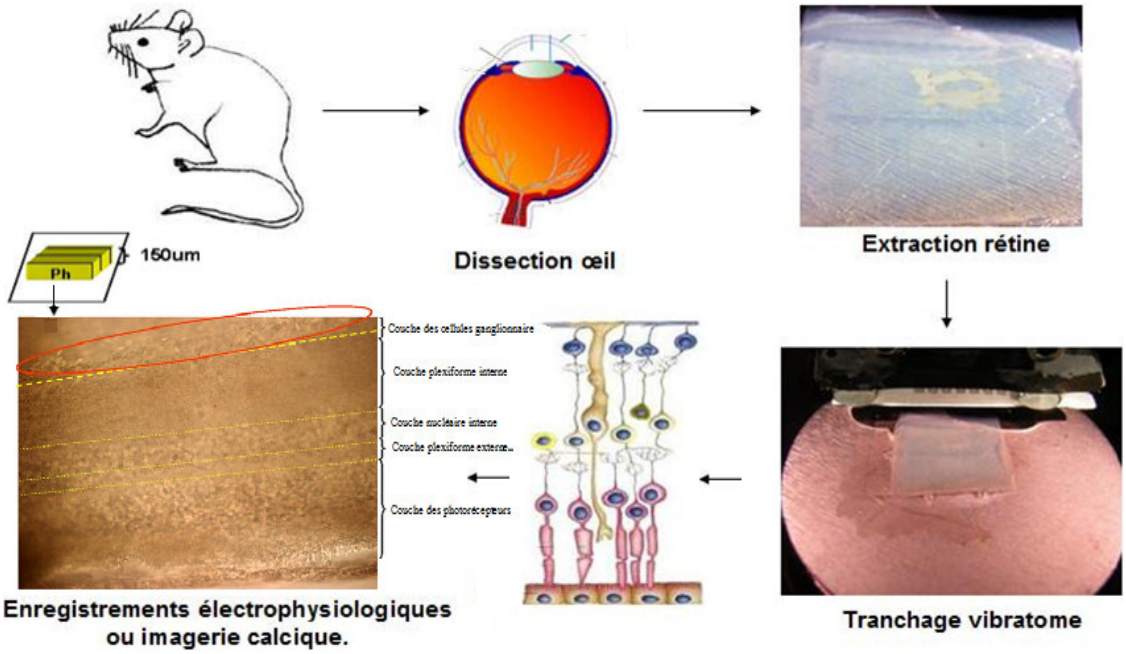


Figure 2 : Description des étapes successives de la préparation de tranches de rétines de souris.

Ce modèle permet de faire apparaître toutes les couches formant la rétine tout en réalisant une étude sélective d'une catégorie de population cellulaire, dans notre cas les cellules ganglionnaires de la rétine. Les cellules ganglionnaires sont identifiées par leur position dans la tranche (la couche des cellules ganglionnaires est adjacente à la couche fibreuse du nerf optique) et aussi selon la forme de leur corps cellulaire. Le protocole de ce modèle est donné en annexe 1. Toutefois, l'utilisation de tranches de rétine présentait des difficultés supplémentaires pour la mise en place des différents éléments permettant la stimulation et l'enregistrement des réponses biologiques. Ces difficultés sont causées par le placement de la tranche et la couche d'agarose qui la recouvre. Pour ces raisons, l'utilisation d'un modèle biologique moins proche de l'in-vivo mais plus stable a été choisi : la culture cellulaire.

2.1.2.2. Culture cellulaire.

En biologie, la culture cellulaire désigne un ensemble de techniques utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme ("ex-vivo"). Ce modèle présente l'avantage d'offrir une plage de durée de test beaucoup plus importante (de l'ordre de cinq heures). Les techniques de mise en culture varient suivant le type de cellule étudiée. Le protocole de ces modèles est donné en annexe 1.

a. Culture de cellule ganglionnaire de la rétine (CGR).

Les cellules ganglionnaires isolées en milieu de culture sont cultivées sur un support nutritif dans des boîtes de pétri[1]. L'échantillon ne contenant uniquement que les cellules désirées, la détection et le placement du stimulateur s'en trouvent facilités par rapport aux tranches de rétine. Cependant, la culture de CGR est très complexe de par le nombre d'étapes à respecter et les risques de contamination. Sachant que la mise au point des différentes étapes du protocole de culture est longue, le choix a été fait d'utiliser parallèlement un modèle de culture biologique déjà parfaitement maîtrisé à l'INM.

b. Culture de cellule ganglionnaire de l'appareil vestibulaire (CGV).

L'équipe Physiologie et physiopathologie des désordres vestibulaires de l'INM dirigée par Christian Chabbert a mis à notre disposition son modèle de culture de neurones primaires vestibulaires du rat. L'utilisation de ce modèle de neurone correspond à une étape intermédiaire primordiale qui a permis de finaliser les différents bancs de stimulation et de procéder aux premiers tests de calibration sur des neurones. L'expérience gagnée au cours de ces tests nous a permis de nous mettre dans les conditions optimales pour l'objectif prioritaire de ma thèse : la stimulation des cellules ganglionnaires de la rétine.

c. Difficulté d'utilisation des cultures.

L'âge optimal pour l'utilisation des cellules correspond à un temps d'incubation compris entre 4 et 6 jours. Les tests effectués en dehors de cet intervalle montrent que les cellules ne supportent pas la stimulation. Même dans le cas de cultures de cellules vestibulaires dont la mise en œuvre est basée sur un protocole connu et robuste utilisé depuis plusieurs années à l'INM, le nombre de cellules et leur viabilité ne sont pas garantis. La réactivité des cellules testées est un paramètre très important à prendre en compte dans l'interprétation de réponses enregistrées.

[1] Une boîte de Petri est une boîte cylindrique transparente peu profonde, en verre ou en plastique inventé en 1887 par le bactériologiste allemand Julius Richard Petri (1852 – 1921).

2.2. Description des bancs de mesures.

2.2.1. Test in vitro.

2.2.1.1. Technique du patch clamp.

La technique du patch clamp est une technique électrophysiologique permettant de mesurer l'activité électrique d'un corps cellulaire en mesurant directement le courant généré par les flux d'ions. Cette méthode que nous devons à Erwin Neher et Bert Sakmann [67] (prix Nobel 1991) a permis une avancée considérable dans les sciences du vivant en permettant de considérer le système nerveux comme une entité multi cellulaire observable d'un niveau microscopique. Cette technique est à l'origine des traitements médicaux modernes visant à commander chimiquement le fonctionnement de cellules afin de bloquer certains dysfonctionnements responsables de maladies nerveuses.

a. Fonctionnement de principe et matériel.

Au cours du fonctionnement normal d'une cellule les ions traversent la membrane par le biais de protéines canaux spécifiques (annexe 2). Or, lors de l'ouverture et du passage d'ions à travers ces canaux, une différence de potentiel apparaît aux bornes de la membrane. La technique du patch clamp permet de mesurer ces courants ioniques circulant au travers de la membrane cellulaire.

Les cellules étudiées sont déposées dans un bain d'une solution saline physiologique extracellulaire (riche en sodium, 135 mM), dite aussi solution extrapipette. La prise de mesure est effectuée au moyen d'une électrode d'argent chlorurée (avec de l'eau de javel pure) de manière à constituer une électrode Ag/AgCl. La conversion des courants ioniques en courant électrique est régie par l'équation suivante :

$$Ag + Cl^- <-> AgCl + e$$

Cette électrode est insérée dans une micropipette remplie d'une solution saline proche de la composition du milieu cytoplasmique (solution intrapipette riche en potassium, 140mM). La

micropipette est obtenue par l'étirement d'un tube microhématocrites (capillaire de verre) de 0,95mm de diamètre, chauffé simultanément en son centre par un filament en tungstène. Cette technique permet d'obtenir deux micropipettes de 5 cm de long et dont l'extrémité varie de 100 nm à 20 µm. Celle-ci est fixée sur un pré-étage amplificateur à gain variable qui réalise la conversion et l'amplification du courant (pA ou nA) en tension (mV), elle-même fixée sur un micromanipulateur. Sous un microscope et à l'aide des micromanipulateurs, l'utilisateur fait rentrer en contact la pointe de la microélectrode avec la membrane cellulaire. Pour sceller ce contact, l'utilisateur exerce une légère aspiration afin que la membrane s'invagine de quelques microns dans la pipette (Figure 3).

Cette technique permet d'obtenir un fort scellement entre la membrane et la pipette de verre appelé « giga-seal », c'est-à-dire un scellement dont la résistance dans les solutions électrophysiologiques classiques (dont la conductivité est de l'ordre 1 S/m) varie entre 1 et 20 GΩ en général. Les courants mesurés étant de quelques pico-ampères, ce mode opératoire permet de réduire le bruit ambiant lors de la visualisation et l'enregistrement du courant électrique induit par le passage des ions au travers des protéines canaux.

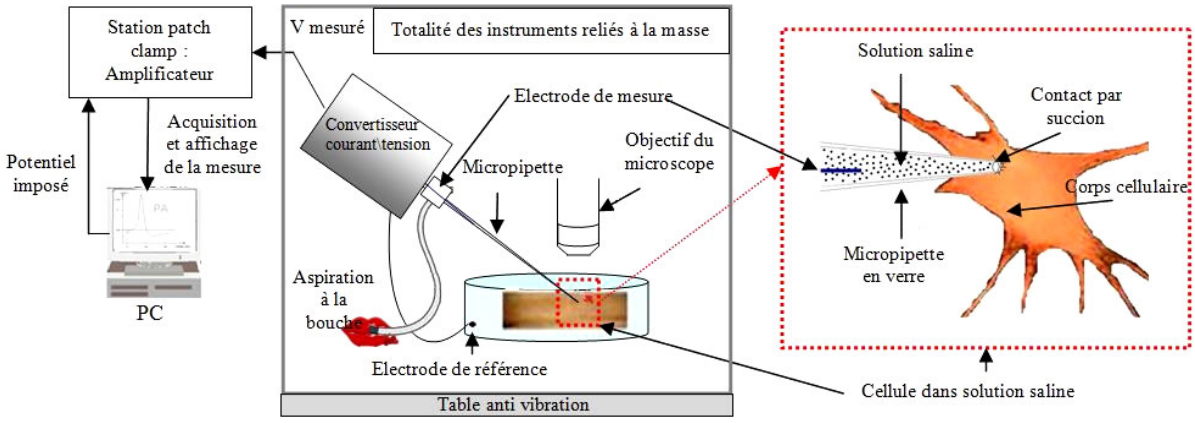


Figure 3 : Schéma de principe d'une station de mesure patch clamp.

Le signal après pré amplification est envoyé à la station patch clamp qui réalise une dernière amplification permettant d'obtenir une tension comprise entre 0 et 5V. Finalement, une carte d'acquisition réalise la conversion analogique numérique et permet d'enregistrer et d'afficher le résultat sur l'ordinateur.

La mesure de signaux de si faible amplitude entraîne obligatoirement la prise en compte de toutes les perturbations provenant de l'environnement extérieur. Pour éviter les perturbations mécaniques, l'ensemble du système de mesures est posé sur une table anti-vibrations pour sécuriser le contact fragile entre la cellule et la pipette en verre. Contre les perturbations

électromagnétiques (notamment en cas de proximité de néon, réseau électrique, téléphone portable), la solution consiste à donner une référence commune à tous les éléments du banc de mesure, qui peut aussi être enfermé dans une cage Faraday.

b. Configuration des mesures.

La mesure suit la loi d'Ohm U=R.I avec :

- U la différence de potentiel aux bornes de la membrane.
- R la résistance membranaire.
- I le courant ionique.

Par le biais de la micropipette, l'utilisateur a le choix entre deux modes de mesure. Il peut, soit fixer le courant I afin de mesurer la tension U (« configuration courant imposé ») ou, à l'inverse, fixer la tension V pour mesurer le courant I (« configuration voltage imposé »). Pour chaque mode, il existe 4 configurations dans lesquelles l'électrode peut être mise en contact avec la cellule :

- Cellule attachée (Cell-attached ou loose-patch) : Cette configuration est obtenue directement une fois que le contact cellule/pipette est réalisé (giga-seal). C'est la seule configuration qui conserve l'intégrité du milieu intracellulaire et la valeur du potentiel de membrane, et permet d'étudier et de conserver les mécanismes intracellulaires responsables de l'activité du canal étudié. Seul le courant issu des canaux contenus dans le morceau de membrane emprisonné est mesuré. Dans le cas d'une faible densité de canaux sur la membrane, on parvient à n'emprisonner que quelques canaux, voire un canal unique, et faire ce qui est communément appelé du « single-channel ». Ce type de mesure permet par exemple d'étudier la statistique d'ouverture des canaux.
- Cellule entière (Whole-cell): L'application d'une aspiration plus importante que celle utilisée en mode « cell attached » entraîne une rupture locale de la membrane cellulaire. Le milieu intra cellulaire se trouve en contact direct avec la solution interne de la pipette. Il devient possible dès lors, de mesurer les fluctuations du courant global ou du potentiel de membrane tout en contrôlant la composition ionique du milieu intracellulaire.

- Inside out : La cellule est sacrifiée car une partie de la membrane est extraite de la cellule. Dans cette configuration, le milieu intra pipette joue le rôle de milieu intracellulaire et la face interne de la cellule devient la face externe. Cette technique permet de réaliser l'étude unitaire de certains canaux ioniques.
- Inside in : Une partie de la membrane est extraite de la cellule et présente sa face interne à l'intérieur de la pipette. Cette méthode est utilisée pour l'étude de canaux non mesurables en configuration Inside out.

Pour le besoin de notre étude, deux techniques ont été préférées (Figure 4): il s'agit des configurations Cell-attached et Whole-cell. Il est important de pouvoir étudier le fonctionnement et les réactions de la cellule dans sa globalité lorsqu'elle est au repos ou stimulée. Les tests ont finalement été réalisés en configuration whole cell.

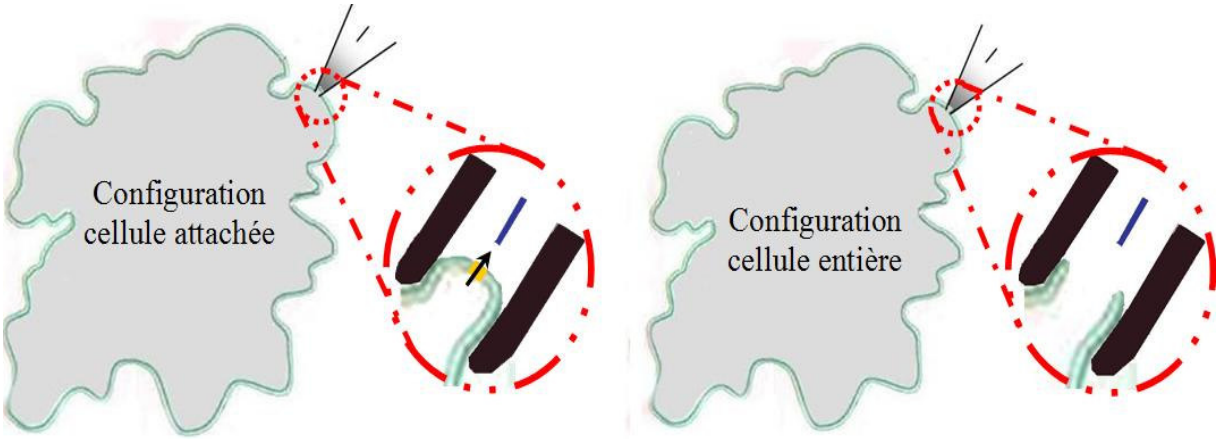


Figure 4 : Configurations des techniques de patch clamp utilisées.

La technique d'imagerie de fluorescence des ions calciques sur culture cellulaire est ainsi apparue comme une solution adaptée à nos besoins immédiats. Le choix d'utiliser cette technique sur culture cellulaire permet de prolonger la durée des tests, car l'environnement intracellulaire est moins perturbé. De plus, les cellules en culture sont facilement accessibles ce qui permet une meilleure approche ainsi qu'un bon positionnement de la stimulation optique. Une fois le marqueur fluorescent intégré au milieu cellulaire, il suffit de positionner le stimulateur sur la zone souhaitée. Cette approche permet de réaliser des tests en plus grand nombre.

2.2.1.2. Technique d'imagerie de fluorescence des ions calciques.

Nous venons de voir que le patch clamp rend possible la mesure des variations du potentiel membranaire en temps réel au cours d'un potentiel d'action. Si le potentiel d'action est considéré comme le premier messager dans la communication inter-neurones, il existe un deuxième messager tout aussi fondamental : le calcium. Ce dernier tient plusieurs rôles primordiaux d'un point de vue physiologique. Il permet, entre autres, de réguler des sécrétions hormonales, d'effectuer des mutations génétiques, de provoquer des contractions musculaires. Ce qui nous intéresse ici est son rôle dans l'excitation neuronale : observer des entrées calciques dans une cellule au cours d'une excitation extérieure indique que les paramètres de stimulations choisis entraînent une réponse biologique.

a. Préparation des cellules.

La méthode consiste à rajouter un marqueur fluorescent qui vient se lier aux ions calciums. La particularité de ce marqueur est qu'il émet une lumière par fluorescence lorsqu'il est excité par un photon d'une longueur d'onde précise. Au cours de ma thèse, le marqueur fluorescent du calcium Fluo3-Acetoxymethoxyester (Fluo 3-AM) a été utilisé. Cette substance chimique émet une lumière verte pour une excitation à deux longueurs d'onde différentes suivant la configuration où elle se trouve. Ainsi, elle sera excitable pour une longueur d'onde de 780 nm si elle est liée à un ion calcium, et à 580 nm si elle est libre. Le but de ce test étant de visualiser l'afflux de calcium au niveau d'un neurone, nous nous sommes intéressés au cas où le marqueur est en configuration liée.

b. Le microscope de fluorescence biphotonique.

Comme son nom l'indique, le microscope de fluorescence biphotonique permet une stimulation simultanée de la zone visée par deux photons. Cette technique permet une excitation plus localisée d'excitation à photon unique. L'excitation des marqueurs fluorescents nécessite une puissance optique importante qui est fournie par un laser pulsé « femtoseconde » de type Titane-Saphir (ici le modèle Tsunami de la marque Spectra Physic) émettant des impulsions dans l'infrarouge à des valeurs comprises entre 700 et 1000 nm. De fait, cela rend possible une pénétration plus grande dans les tissus sur un faible volume

d'excitation avec une diminution de l'effet de photo-blanchiment[2] liée à la stimulation. Le taux d'absorption des photons plus important en mode multiphoton entraine une faible dispersion de la lumière et permet une élimination quasi totale de la fluorescence hors plan focal. Bien que limitée à une plage de longueur d'onde restreinte (700 -1 000 nm), ce dispositif permet l'utilisation de multiples fluorophores.

Lors d'une stimulation entraînant l'excitation d'un fluorophore, la fluorescence est captée par un photomultiplicateur à balayage sensible au spectre visible. Le signal capté est ensuite affiché sur un écran de visualisation permettant d'observer en temps réel l'activité cellulaire sous forme de flash lumineux (Figure 5).

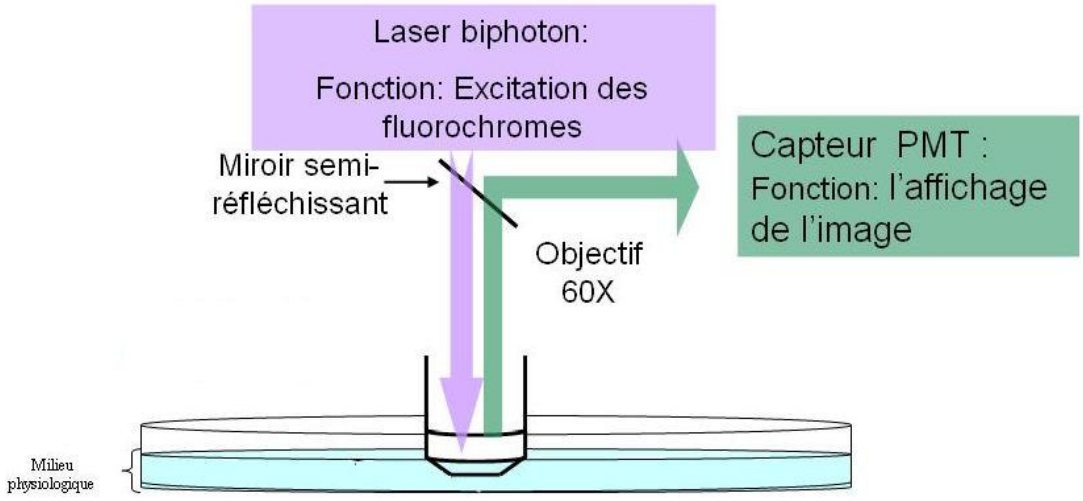


Figure 5 : Principe de l'imagerie de fluorescence biphotonique.

c. Interface utilisateur.

Le logiciel utilisé (Bio-Rad Laboratories) permet de sélectionner des zones précises dans le champ visuel apparaissant sous l'objectif du microscope. L'utilisateur peut choisir une vue en prise directe ou en fausse couleur contrastée qui permet d'afficher à l'écran le niveau de fluorescence proportionnellement à la densité de fluorophores au cours de l'excitation biphotonique (Figure 6). Pour les mesures, l'utilisateur entoure les zones correspondantes au corps cellulaire jugé intéressant ainsi qu'une zone sans cellule qui servira de référence pour la mesure.

[2] Réaction photo-chimique non désirée lors de l'irradiation qui se traduit par une perte progressive de l'intensité de fluorescence émise par un échantillon

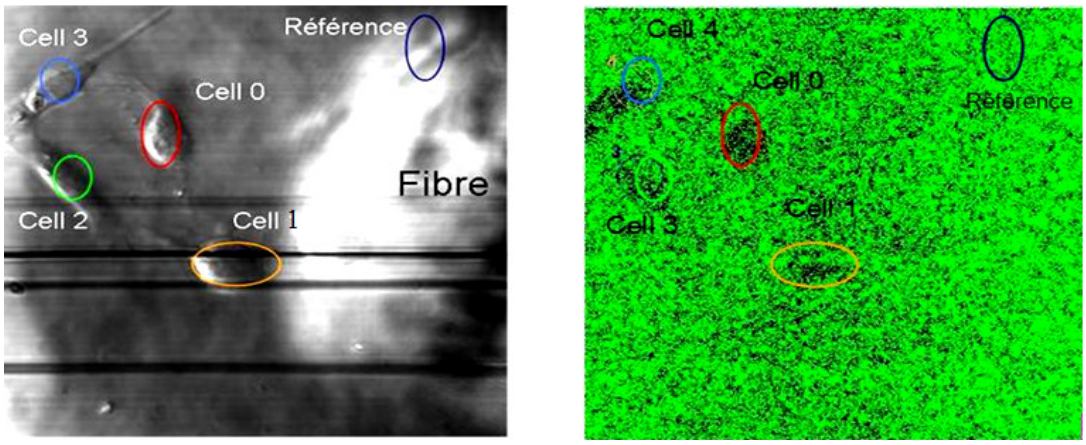


Figure 6 : Sélection des zones correspondant aux cellules et de la référence à prendre en compte lors d'une mesure d'imagerie de fluorescence biphotonique.
A : prise de vue directe. B : rendu en fausse couleur pendant la stimulation biphotonique.

Lors du test, la visualisation des variations lumineuses apparaît en temps réel de deux manières différentes (Figure 7). La première, sous forme de graphique déroulant où sont affichées les courbes correspondantes à la moyenne des intensités lumineuses de chaque pixel contenu dans chaque zone préalablement sélectionnée. La deuxième correspond à l'image de la fluorescence dans le champ visuel de l'objectif.

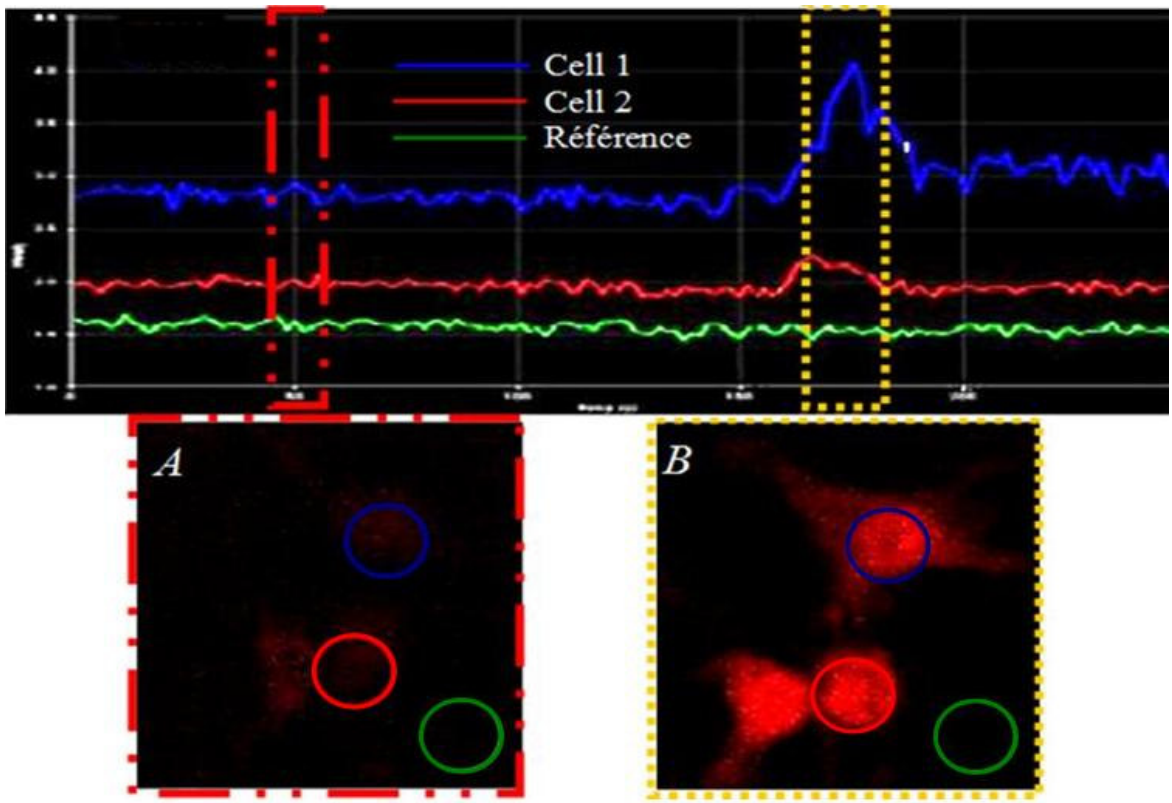


Figure 7 : Visualisation de l'afflux de calcium au niveau d'un neurone du vestibule.
A : sans stimulation, B : après une stimulation.

2.2.2. Test in vivo.

Les tests in vitro doivent nous permettre d'observer les effets de la stimulation laser sur une cellule isolée ou sur un groupe de cellules permettant d'intégrer la notion de « champ récepteur » pour paramétrer notre signal de stimulation. Ces tests doivent permettre de vérifier si le cerveau reçoit et interprète les potentiels d'action générés par le laser au niveau des cellules ganglionnaires. Dans cette partie, seront présentés les examens permettant de détecter l'activité du cerveau au niveau du cortex cérébral lors d'une stimulation lumineuse de la rétine.

2.2.2.1. L'examen des potentiels évoqués visuels (PEV).

Les potentiels évoqués visuels (PEV) mesurent l'activité des voies visuelles qui se composent des cellules ganglionnaires (dont les axones forment le nerf optique), des radiations optiques thalamo corticales et des aires visuelles. La figure 8 donne l'allure typique d'un tracé de PEV. Sur cet exemple, on peut montrer que les ondes inférieures à 50 ms de latence représentent l'activité électrique sous-corticale du corps genouillé latéral qui reçoit les fibres axonales des cellules ganglionnaires. La grande onde positive qui apparaît vers 100 ms désigne la réponse de l'aire primaire de la vision située dans le cortex occipital.

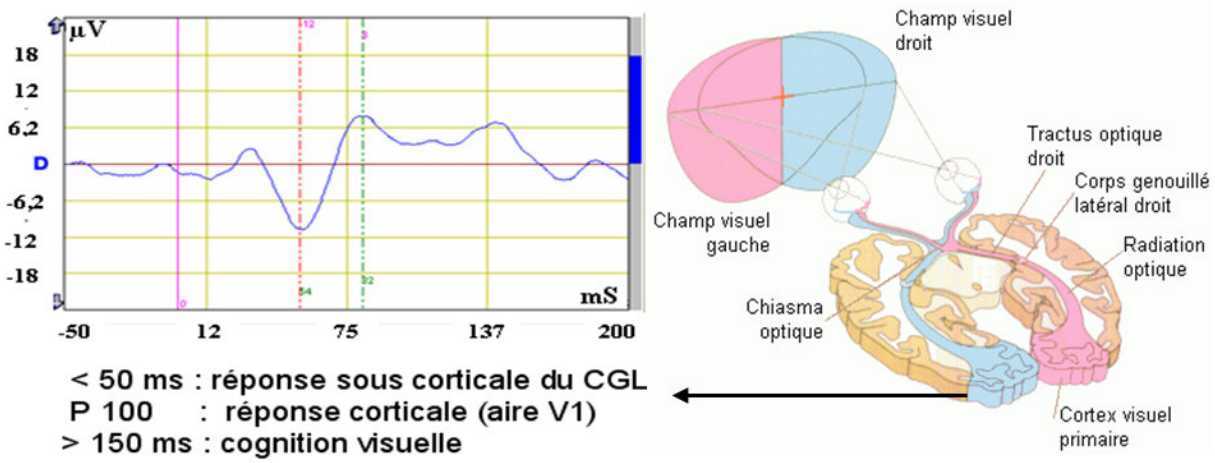


Figure 8 : Exemple d'enregistrement d'un potentiel évoqué visuel (PEV).

2.2.2.2. Dispositif d'enregistrement.

Des électrodes de mesure sont placées sur la région occipitale du crâne en regard des électrodes de référence posées en sous-cutané sur le museau de l'animal. La souris équipée d'électrodes est installée dans le caisson de simulation où elle est soumise à des flashs lumineux intenses (Figure 9). Cette méthode permet d'éclairer uniformément et brièvement la totalité de la surface de la rétine de la souris dont les yeux sont maintenus ouverts. Le signal mesuré est récupéré par un amplificateur qui traite le signal avant de le transmettre à l'ordinateur pour acquisition. La mesure d'un PEV à l'écran correspond à la moyenne des signaux relevés au cours d'une stimulation. Traditionnellement, il faut de 30 à 60 impulsions de 5 ms pour une période d'une seconde pour visualiser un PEV. Ce nombre de stimulations est nécessaire pour avoir une réponse optimale de la part de la rétine, car il faut attendre que les cellules se soient synchronisées entre elles afin de réagir en rythme à l'excitation lumineuse. Les premières stimulations servent principalement à harmoniser la réponse des cellules de la rétine, les suivantes permettant une mesure fiable et précise.

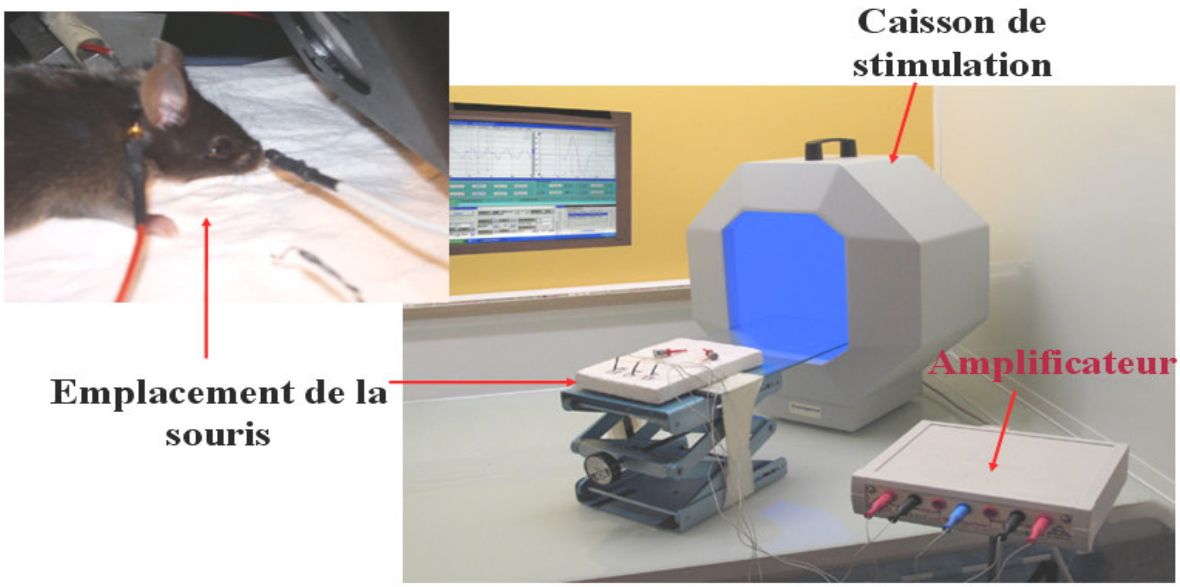


Figure 9 : Dispositif d'enregistrement de PEV et ERG par flash en place à l'INM.

2.3. Description du système de stimulation optique.

Notre objectif était de garder toutes les fonctionnalités des bancs de mesure déjà opérationnels en y ajoutant notre stimulateur optique. Différentes stratégies ont été choisies suivant les caractéristiques techniques de chaque système. Au final, chaque banc de test permet la mesure et la sauvegarde des données au cours d'une stimulation optique. A part le cas de l'imagerie de fluorescence calcique où les mesures de la caméra à une fréquence de 1 Hertz ne permettent pas une bonne précision temporelle, il est possible d'enregistrer et visualiser de manière synchrone les signaux de stimulation et les réponses biologiques. Cette double acquisition permet de mesurer le temps de réponse (latence) après stimulation.

Cette partie débute par une description des lasers utilisés et du banc permettant de les contrôler. Par la suite, les choix techniques et stratégiques utilisés pour adapter notre stimulateur laser aux différents bancs de tests sont détaillés.

2.3.1. Choix et étalonnages des lasers.

Avant de détailler les adaptations du stimulateur laser réalisées sur les différents bancs de mesure détaillés si dessus, un travail d'étude et d'ingénierie a été réalisé pour concevoir le système de stimulation optique. Cette partie est consacrée aux différents aspects à prendre en considération lors du choix des lasers et du matériel permettant de les commander. Nous détaillerons les solutions et l'évolution du banc optique en réponse aux difficultés liées aux montages optiques ou aux contraintes imposées par le milieu des échantillons à tester.

2.3.1.1. Spectre d'absorption du milieu physiologique.

Au début de notre étude, nous nous sommes basés sur la littérature disponible sur le travail de plusieurs équipes travaillant sur la stimulation par laser de tissus neuronaux, autres que la rétine. Les longueurs d'onde utilisées pour l'excitation du nerf sciatique ou du nerf auditif sont de 2200 nm et 1870 nm [59, 56]. Ces deux longueurs d'onde semblent offrir une plage de stimulation confortable tout en ne causant aucun dommage aux tissus neuronaux visés. Ces équipes ont basé leur choix sur le spectre d'absorption de l'eau (Figure 10). Ce choix s'explique par le fait que la lumière doit d'abord traverser une épaisseur de liquide avant d'atteindre les cellules qui sont elles-mêmes composées à 70% d'eau. Connaître avec

exactitude le spectre d'absorption du liquide permet de déterminer l'énergie lumineuse efficace reçue par la cellule suivant la longueur d'onde utilisée et l'épaisseur d'eau à prendre en considération.

Nous avons dans un premier temps travaillé avec des lasers de longueur d'onde 2200 nm fabriqués par l'équipe Composants à NANOstructures pour Moyen InfraRouge (NANOMIR) de l'Institut d'Electronique du Sud (IES). Nous avons également fait l'achat de trois lasers fibrés de la marque Sheaumann possédant des longueurs d'onde de : 1870 nm, 1530 nm, 1470 nm.

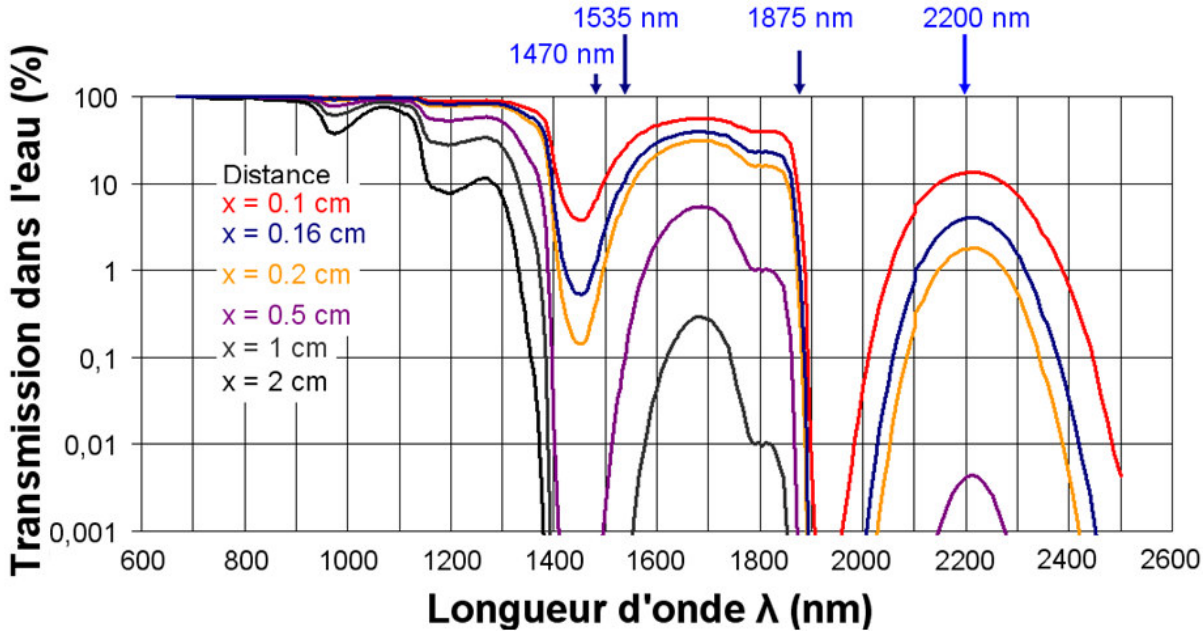


Figure 10: Pourcentage de puissance lumineuse traversant x cm d'eau en fonction de la longueur d'onde.

Le choix des lasers à 1875 nm, 1470 nm s'explique par la similitude de leurs coefficients d'absorption dans l'eau avec celui à 2200 nm. Le laser à 1535 nm permet de comparer la réaction des cellules à un faisceau laser ayant une longueur d'onde présentant un coefficient d'absorption moins important. Chaque laser permet d'obtenir en moyenne, des puissances optiques maximum en sortie de fibre de 100 mW à 500 mW, excepté pour les lasers à 2200 nm qui, suivant leur technologie, atteignent de 10 mW à 100 mW.

L'étape initiale a été de mesurer et de vérifier le coefficient d'absorption du liquide physiologique pour les quatre longueurs d'onde étudiées.

La mesure consiste à venir placer une fibre optique en face des détecteurs : une photodiode InGaAs FGA20 (Thorlab) et un puissance-mètre 13PEM001 (ML GRIOT). Si les mesures des trois lasers commerciaux ont été réalisées avec le puissance-mètre, ce dernier ne possédait pas

une sensibilité adaptée à la faible puissance du laser de 2200 nm. A cette longueur d'onde, la photodiode a été utilisée. Uniquement pour cette mesure, le faisceau laser divergent en sortie de fibre passe par une lentille qui permet de le rendre parallèle pour une meilleure réception du signal par la zone sensible du photodétecteur (Figure 11).

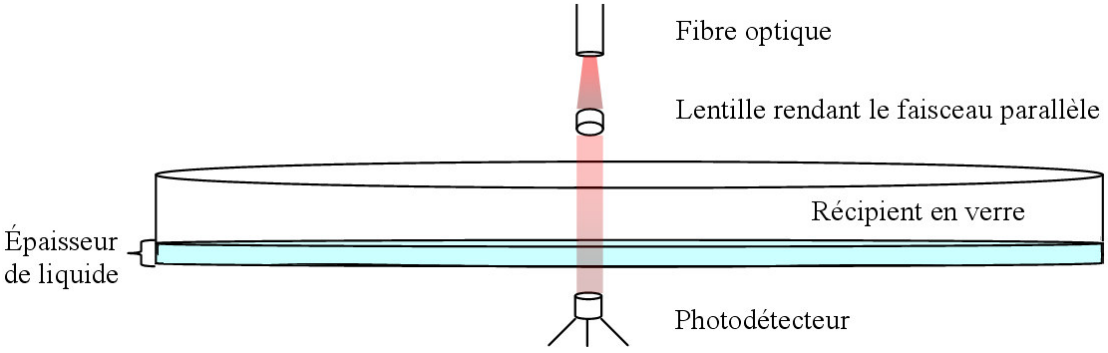


Figure 11 : Banc de mesure du coefficient d'absorption des milieux aqueux employé pour les cellules. (Montage pour le laser à 2,2µm)

Une fois le système en place, une première mesure de référence est réalisée avec le détecteur directement placé en face de la source étudiée.
Par la suite, un récipient de verre est placé entre les deux. Une deuxième mesure réalisée avec le récipient vide permet de connaître l'absorption du verre (Figure 12).

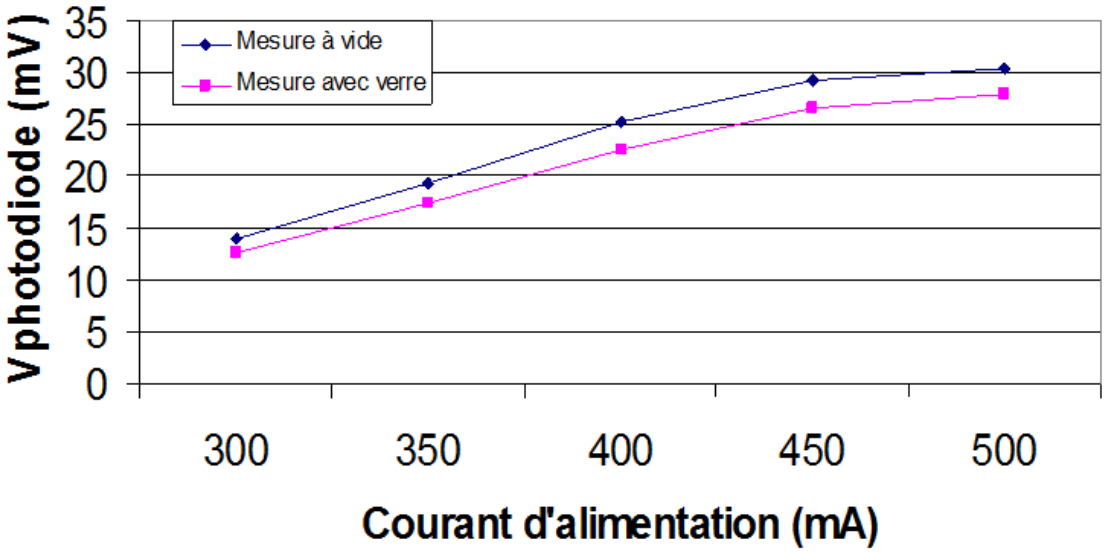


Figure 12 : Mesure du signal optique à vide et à travers du verre pour une longueur d'onde de 2,2 µm.

L'absorption moyenne mesurée est de 9,5 % dans le verre pour une longueur d'onde de 2,2 µm. Ensuite, le récipient est rempli d'eau ou de liquide physiologique. Le récipient a été

choisi assez large de façon à réduire les effets de bord entre le liquide et les parois. Une série de mesures est effectuée pour différentes épaisseurs de liquide afin de vérifier la courbe théorique utilisée. Les valeurs des résultats données représentent la moyenne de dix séries de tests réalisés pour une épaisseur d'un millimètre. (Figure 13).

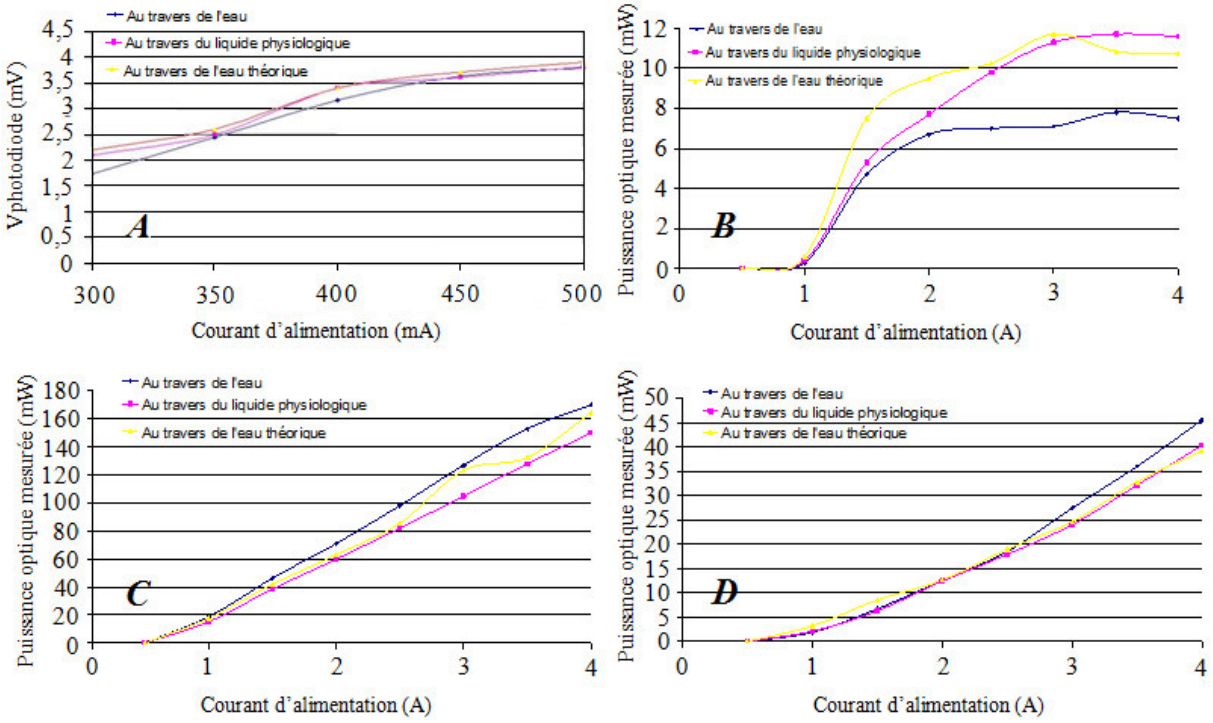


Figure 13 : Mesure du signal optique au travers de 1 mm d'eau ou de liquide physiologique.
A : 2200 nm, B : 1850 nm, C : 1535 nm, D : 1470nm.

Dans le cas, par exemple, d'un laser à 2200 nm, les mesures donnent un α_{phy} de 19,40 cm^{-1} et un α_{eau} de 19,7 cm^{-1} qui correspondent à une absorption de 86.05 % pour l'eau et 85.64 % pour le liquide physiologique. Comparativement, l'absorption théorique de l'eau est de 86.85 % pour un coefficient d'absorption de 20,2 cm^{-1}.

Au vu des résultats, il semble que l'eau et le liquide physiologique aient des coefficients d'absorption assez proches pour les quatre longueurs d'ondes utilisées pour que l'on puisse les considérer comme identiques.

2.3.1.2. Caractérisation des lasers utilisés.

a. Montage optique pour le laser à 2200 nm.

Ces lasers possèdent une zone active composée de puits $GA_{1-x}In_xAs_ySb_{1-y}$ d'une épaisseur de 10 nm, leur puissance optique maximum est de 16mW [68]. Pour faciliter la manipulation du laser de très petite taille (quelques microns), il est fixé sur un support en cuivre côté cathode (—), et son anode (+) est reliée par un fil d'or à un contact. Le support laser est emboîté sur un grand corps en cuivre qui facilite sa manipulation et la dissipation de la chaleur générée lors de son fonctionnement (Figure 14).

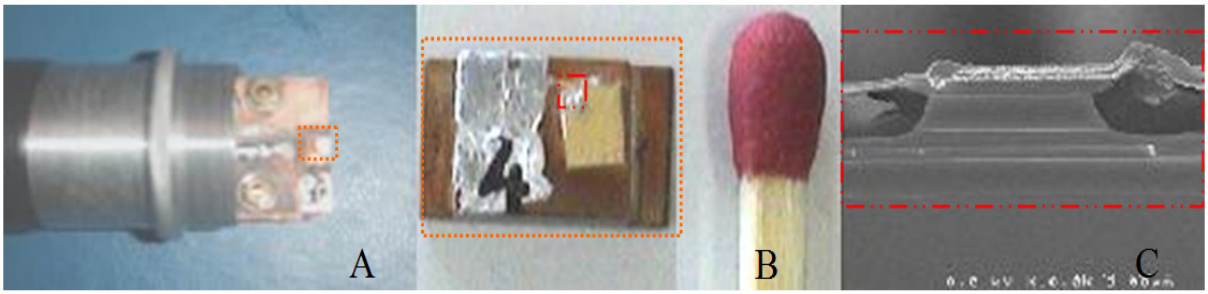


Figure 14: Montage optique pour le laser à 2200 nm.
A : Grand support en *cuivre*, *B : support du laser, C : photo prise par microscopie électronique à balayage (MEB) [d'après Yves Rouillard de l'IES].*

En sortie du laser, le faisceau prend une forme ellipsoïdale d'un angle de 130 ° verticalement et d'un angle de 33 ° horizontalement. Pour notre application, il nous a fallu focaliser le maximum de puissance sur une surface de l'ordre de la centaine de microns. Étant dans l'impossibilité d'observer le spot du laser sur le tissu à l'œil nu (laser IR non visible), nous avons rajouté un éclairage de guidage (dans le spectre visible) qui nous permet de placer le spot de manière optimale pour nos mesures. Pour faciliter la sélection de la zone cible, la solution retenue est l'utilisation d'une fibre optique qui permet de déporter et sélectionner soit le laser de stimulation, soit un laser visible de placement.
Le montage optique qui a été réalisé est présenté sur la Figure 15.

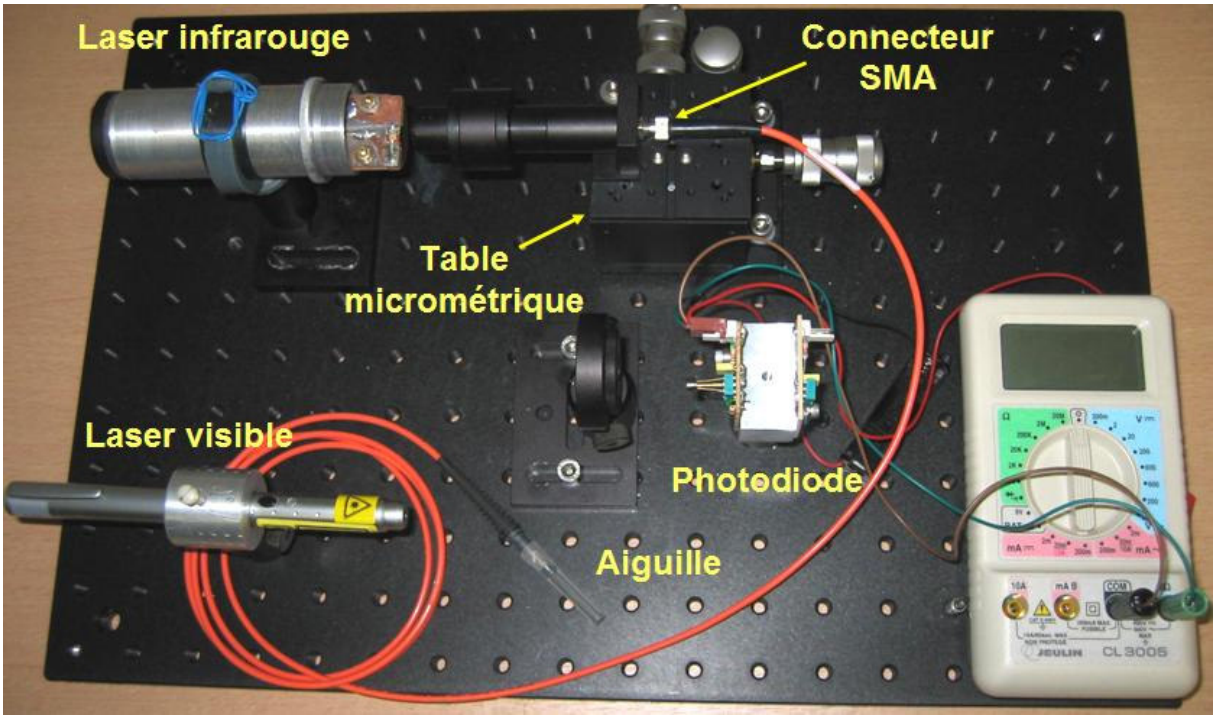


Figure 15 : Montage optique de stimulation pour le laser à 2,2 µm.

Le support laser en cuivre est fixé à la table optique et positionné devant un jeu de lentilles qui permet d'obtenir un spot de 25 µm de diamètre de moyenne. Le montage permet d'injecter le signal dans la fibre avec une grande précision (de l'ordre du micromètre). Dans ce but, nous avons fixé le bloc lentille sur une table micrométrique cinq axes qui permet un alignement optimum avec le laser de manière à injecter le maximum de signal dans la fibre. Afin de vérifier la puissance optique réelle avant chaque série de tests, nous avons rajouté une photodiode nous permettant de vérifier la puissance optique de sortie du laser en fonction du courant.

- *Choix du type de fibre.*

Nous avons opté pour une fibre multimode en silice compatible avec une large gamme de longueurs d'onde (400 à 2400 nm) possédant une transmission en puissance de 99.3 % à 2200 nm. Les fibres choisies (Figure 16) pour réaliser nos tests possèdent un diamètre de cœur de 105, 200 et 400 µm. Elles permettront d'avoir en sortie, une densité d'énergie inversement proportionnelle à la section du cœur de la fibre.

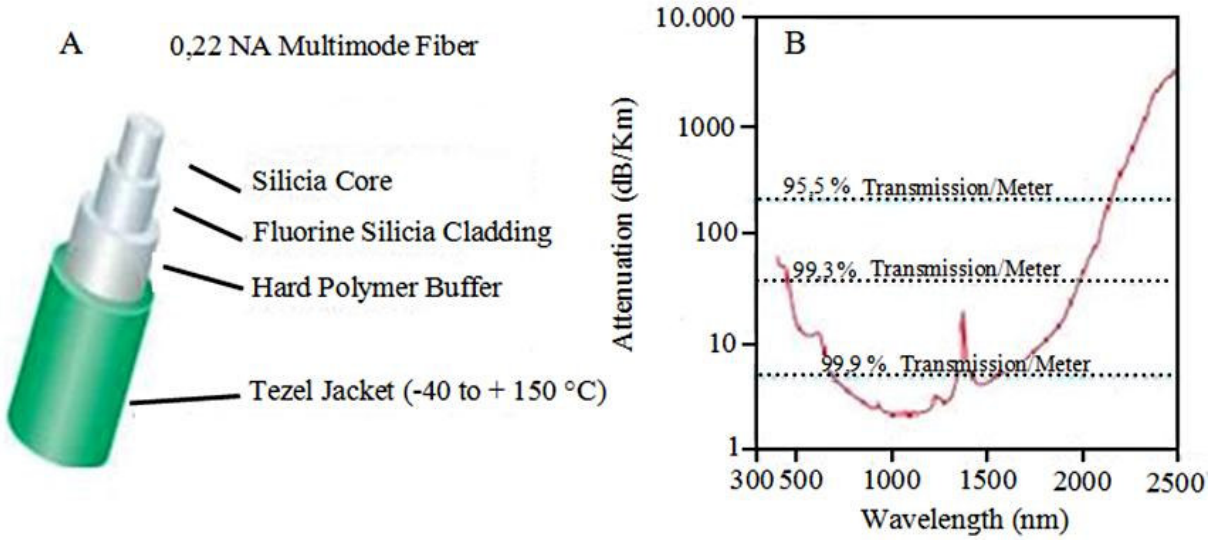


Figure 16: Caractéristiques de la fibre.
A : détails de la structure, B : atténuation fonction de la longueur d'onde.

Nous avons caractérisé les pertes au niveau des lentilles de focalisation. Malgré une répartition de l'énergie de forme gaussienne (énergie concentrée majoritairement au centre) des pertes conséquentes sont observées sur l'axe vertical du faisceau, correspondant à 50 % du signal reçu (Figure 17).

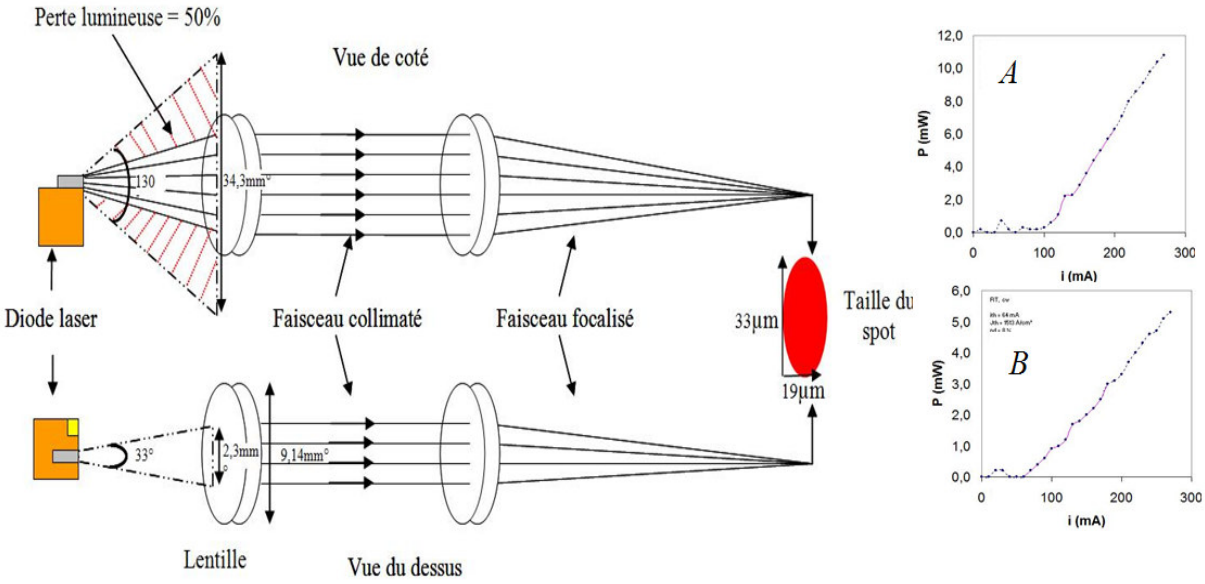


Figure 17 Montage de focalisation à deux lentilles et ses pertes en puissance.
A : mesure de puissance en sortie du laser.-B : mesure de puissance optique après focalisation.

Le banc de test finalisé, nous avons vérifié la puissance en sortie des différentes fibres à notre disposition. Cette étude démontre qu'aucune perte supplémentaire n'est observée dans

les différentes fibres et ce, malgré la taille différente de leurs cœurs. Le couplage est donc optimisé et permet de valider l'utilisation d'une fibre de 105 µm pour nos tests.

b. Montage optique pour les trois lasers commerciaux.

Un deuxième banc de stimulation a été conçu pour accueillir les trois lasers commerciaux vendus connectés à une fibre optique. Ce banc est présenté sur la Figure 18. Les lasers sont montés sur un dissipateur thermique en cuivre muni d'un ventilateur. Les fibres de chaque laser sont vissées sur des connecteurs adaptateurs de type SMA/SMA. Ce montage permet de déporter le signal de sortie du laser sélectionné pour le test en venant visser une fibre « rallonge » prévue à cet effet sans risque d'endommager la fibre d'origine. Ce montage permet également l'injection de la lumière visible pour connaître la zone d'illumination sur les cellules.

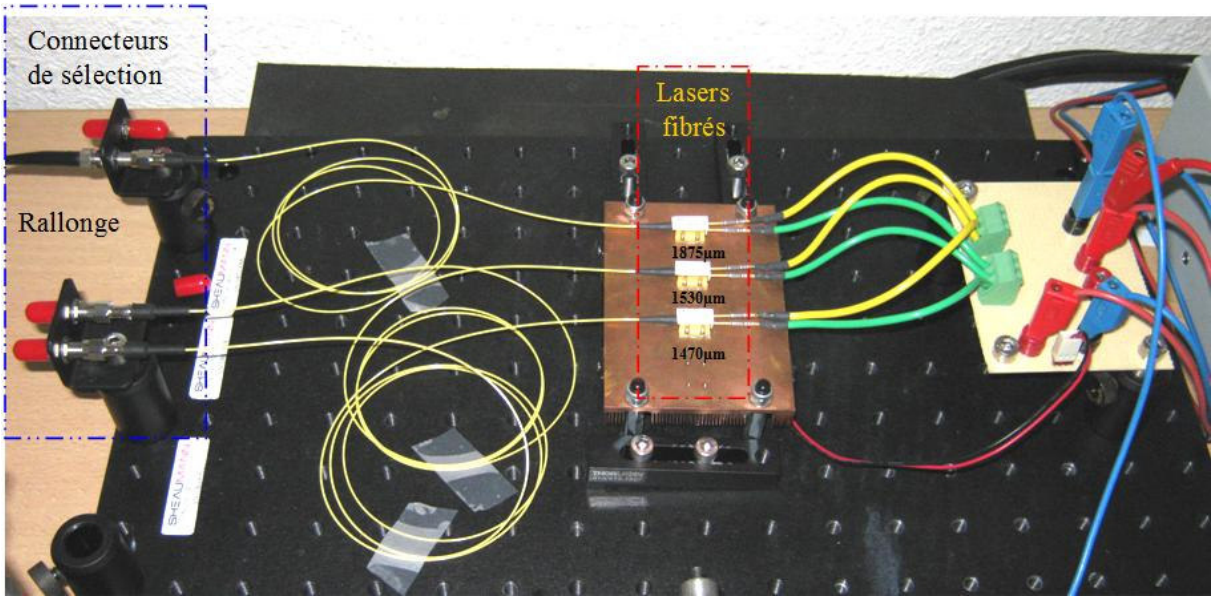


Figure 18 : Montage optique du banc de stimulation laser pour les trois lasers commerciaux.

2.3.1.3. Etalonnage des lasers de puissance utilisés.

Toutes les mesures données dans cette partie ont été réalisées en collaboration avec l'équipe NANOMIR de l'IES.

a. Perte provenant de la connexion fibre laser / rallonge pour chaque longueur d'onde.

La caractéristique de la puissance optique fonction de l'intensité de chaque laser a été tracée pour connaître le pourcentage des pertes de la puissance optique entre la sortie du laser et celle de la rallonge (Figure 19)

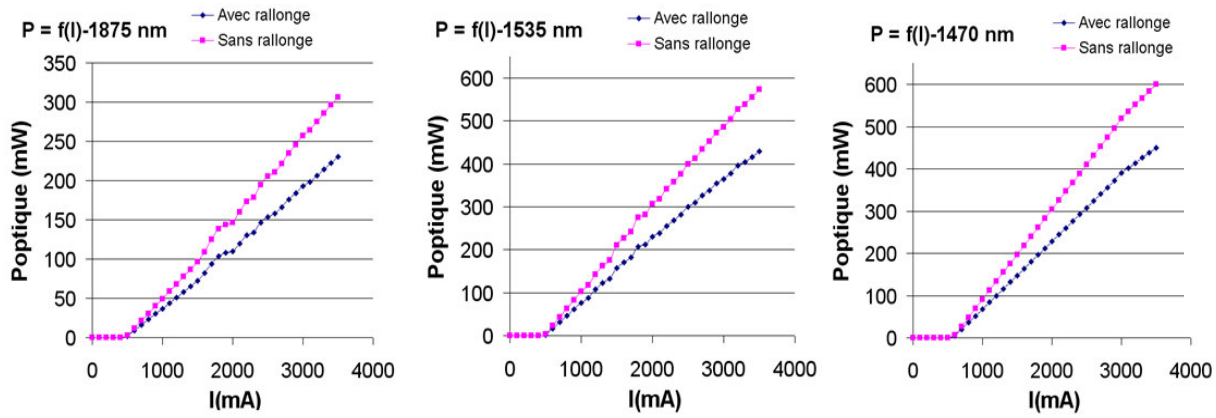


Figure 19 : Mesures des puissances optiques en fonction du courant d'alimentation des lasers avec ou sans la rallonge de fibre de 105 µm de diamètre.

Les mesures indiquent une perte moyenne de 25 % en utilisant la rallonge. Malgré cette perte conséquente du signal, la puissance des lasers commerciaux reste suffisante à notre application.

b. Vérification du spectre de sortie et impact sur le coefficient d'absorption.

Quand une diode laser est alimentée en continu, sa température augmente en fonction du courant injecté. Cette augmentation de température a pour conséquence de décaler la longueur d'onde d'émission de sa valeur initiale. Le système de refroidissement que nous avons choisi (simple ventilateur) ne permet pas une régulation active de la température du laser. Un décalage de la longueur d'onde d'émission des lasers a donc lieu. Nous avons donc mesuré les spectres de chaque laser en fonction du courant d'alimentation (Figure 20).

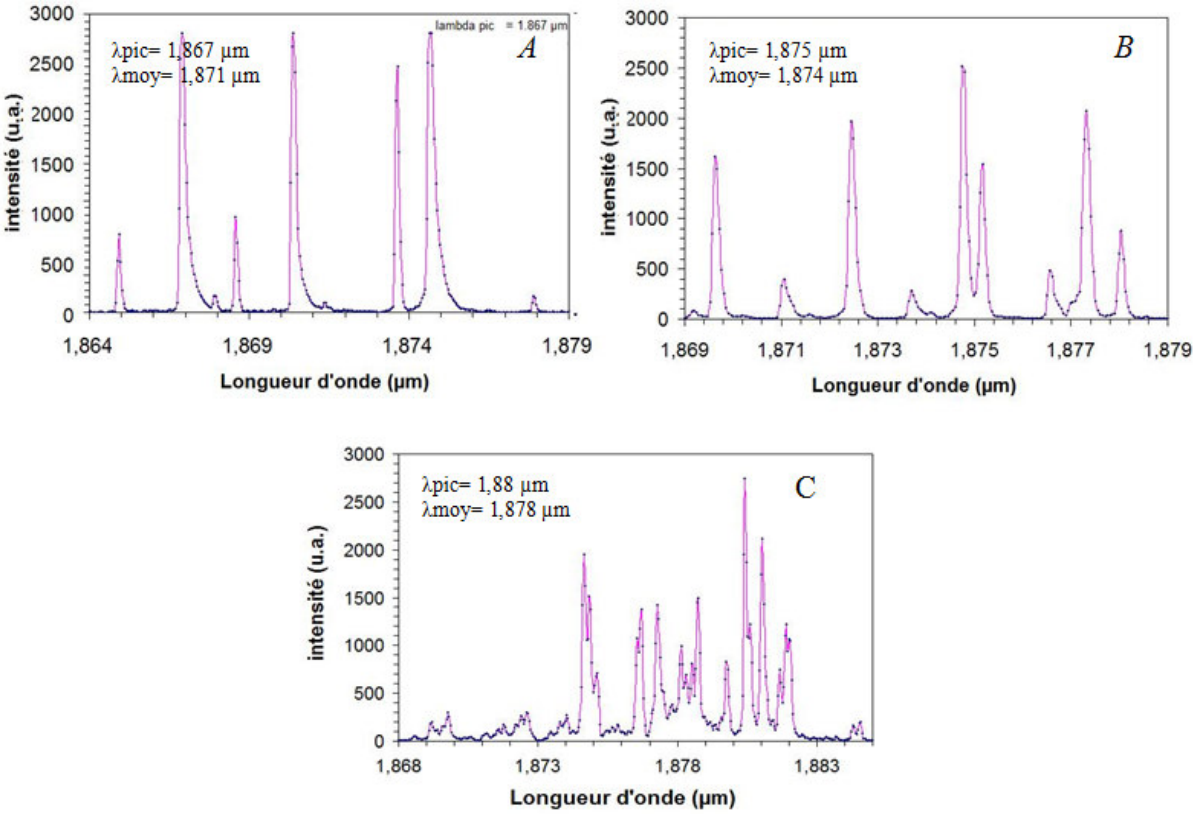


Figure 20 : Réponse spectrale du laser à 1875 nm en fonction du courant injecté (courant continu)
A : 1 A, B : 2 A, C : 3 A.

Les lasers utilisés ne sont pas de type mono mode. Leurs spectres ne sont pas formés d'une seule, mais de plusieurs raies de longueurs d'onde différentes sur une gamme de dix nanomètres. Les mesures ont été réalisées à une température ambiante de 26 °C pour trois valeurs de courant : 1, 2 et 3A. Les caractéristiques nous montrent une variation de la longueur d'onde moyenne si le courant de source augmente. En se servant des caractéristiques fabriquant qui donnent une variation de 0,3 nm par degré, il est possible de connaître l'augmentation de température en fonction du courant d'alimentation. Une mesure de la caractéristique courant-tension du laser réalisée dans le même temps permet de tracer l'augmentation réelle de la température en fonction de la puissance électrique consommée par les lasers (Figure 21).

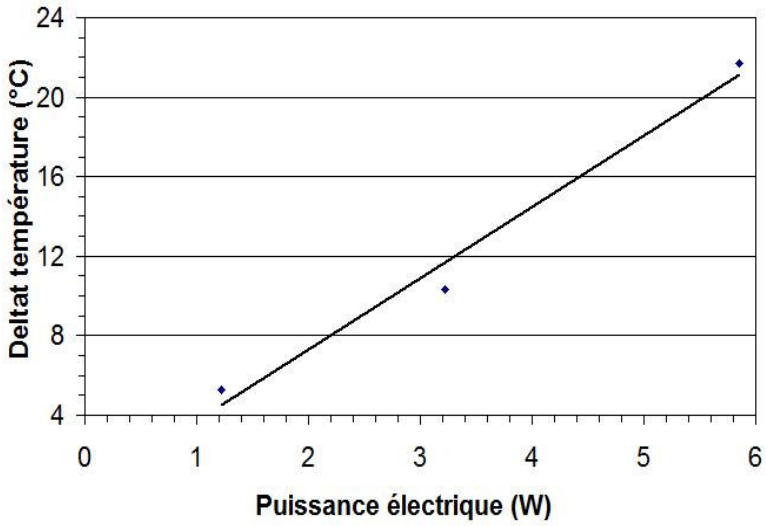


Figure 21 : Détermination de la résistance thermique Rth par la mesure des variations de température en fonction de la puissance électrique.

L'équation de la droite, dans notre exemple y = 3,5816x + 0,155, permet de déduire une résistance thermique de 3,58 $K.W^{-1}$ pour le laser de 1870 nm. Les valeurs de Rth pour les lasers de 1530 nm et 1470 nm sont respectivement de 4,77 $K.W^{-1}$ et 6,38 $K.W^{-1}$. Ces mesures indiquent la bonne tenue des lasers en température avec une résistance thermique de faible valeur. Ces mesures ont permis de déterminer l'impact de l'augmentation de la température sur la longueur d'onde et sur l'absorption dans l'eau (Voir Figure 22, Figure 23 et Figure 24).

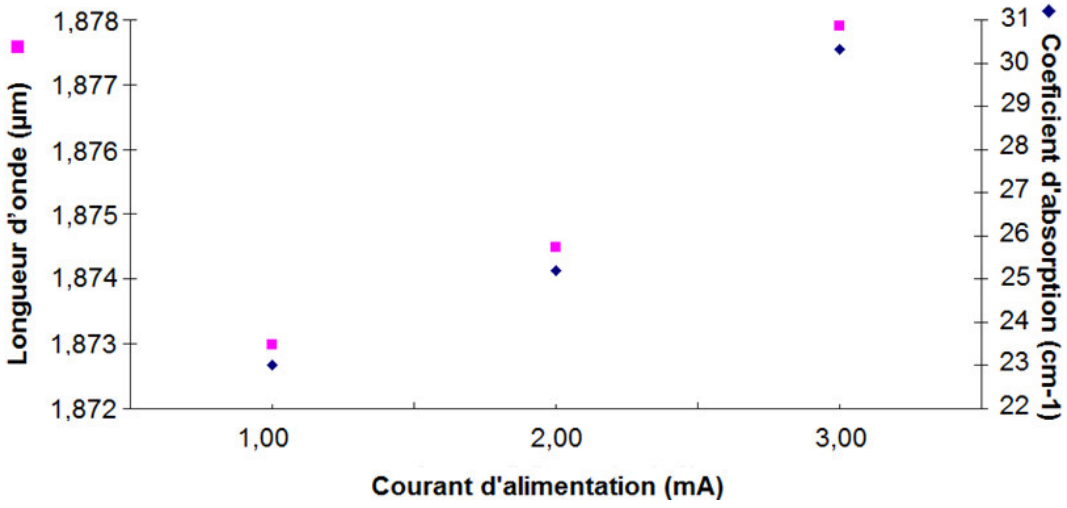


Figure 22 : Variation de la longueur d'onde et du coefficient d'absorption de l'eau en fonction de la variation du courant d'alimentation pour le laser à 1870 nm.

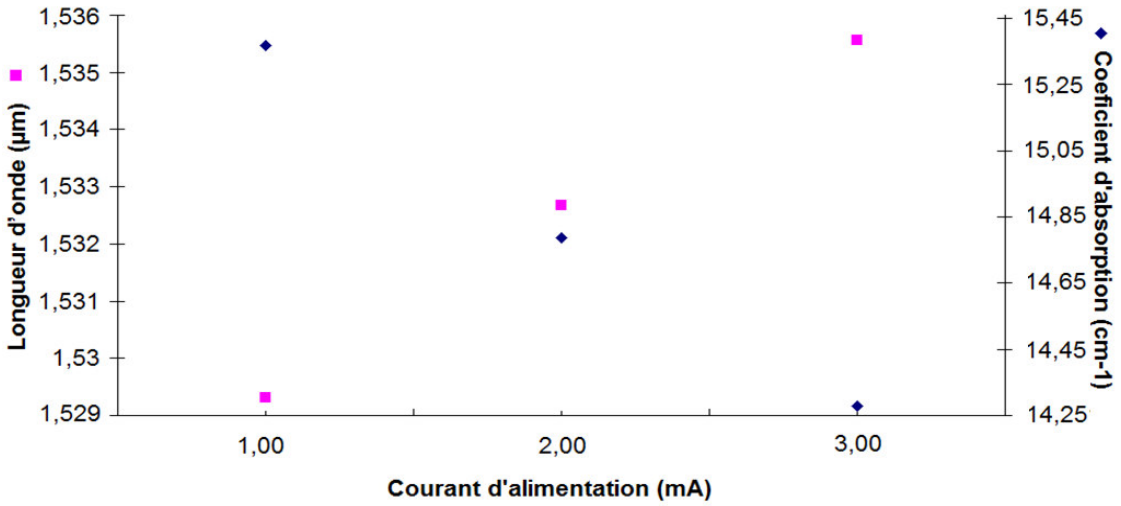


Figure 23 : Variation de la longueur d'onde et du coefficient d'absorption de l'eau en fonction de la variation du courant d'alimentation pour le laser à 1530 nm.

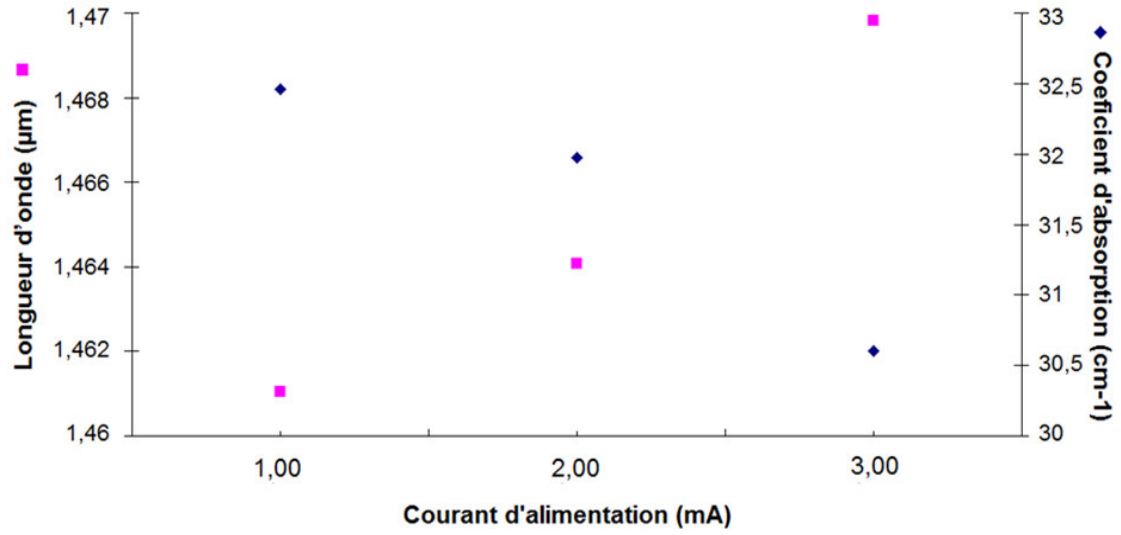


Figure 24: Variation de la longueur d'onde et du coefficient d'absorption de l'eau en fonction de la variation du courant d'alimentation pour le laser à 1470 nm.

Dans l'ensemble, la déviation de la longueur d'onde est à prendre en considération pour chaque laser mais reste assez faible grâce aux faibles valeurs de résistance thermique propre à chacun d'eux. Néanmoins, la moindre déviation entraîne une modification du coefficient d'absorption de l'eau qu'il faudra prendre en compte pour nos tests. Par exemple : pour un laser possédant une longueur d'onde de 1873 nm placés à une distance d'un millimètre, l'absorption est de 89,4 %. Elle passe à 95 % pour une longueur d'onde de 1878 nm. Ces relevés nous permettront de connaître avec précision la quantité d'énergie réellement reçue par la cellule visée.

2.3.2. Commande des lasers.

À notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur le type de stimulation laser à envoyer sur les CGR. En se basant sur les résultats tirés de la littérature (cf. Chapitre 1), nous avons sélectionné une plage de stimulation dans laquelle chaque paramètre peut être réglé. Le système permet d'envoyer de une à plusieurs impulsions lumineuses pouvant aller de 10 µs à 1 seconde. Une interface graphique réalisée sous le logiciel LabVIEW permet à l'utilisateur de choisir le signal de stimulation envoyé par le laser. Chaque paramètre du signal de commande des pulses de stimulation peut être sélectionné dans les limites de fonctionnement autorisées par les appareils composant l'étage « commande laser ». Cet étage est composé d'une source de courant de la marque ILX de la série LDX 3200 et d'une carte d'entrée/sortie de type DAQ 6221 de National Instrument. Dans cette partie est donné le détail des différents composants de la commande laser et de l'interface utilisateur.

2.3.2.1. Source de courant continu modulé en fréquence LDX3232.

La source de courant continu LDX3232 possède deux modes de fonctionnement permettant pour l'un, d'obtenir un courant maximum de 2 A avec une précision de 40 µA, pour l'autre, un courant de 4 A pour une précision de 80 µA. Notre but étant d'obtenir le maximum de puissance de nos lasers, c'est le mode 4 A qui a été retenu. De plus, cette source est intéressante pour notre application car elle permet une modulation de son courant de sortie à une fréquence maximum de 250 kHz. Elle rend ainsi possible la génération de pulses de courant dans la gamme de durée souhaitée de 10 µs à 1 seconde.

Pour rendre la procédure de test pratique et rapide, la source de courant est commandée par protocole GPIB par le biais d'une carte PCI National Instrument. De cette manière, le programme configure la source de courant dans le mode adéquat pour notre utilisation :

- Mode de fonctionnement à 4 A en imposant une limite de courant de 4 A
- Mode « Higth Bandwidth » permettant une fréquence de modulation de 250 kHz.
- Contrôle de la sortie de la source en position marche ou arrêt. La mise en marche préalable de la sortie de la source lui permet d'avoir un temps de réponse adéquat lorsqu'elle est soumise à un signal de commande modulé.

Pour obtenir le courant souhaité en sortie de la source, la documentation constructeur donne une équivalence entre l'amplitude du signal de modulation et le courant en sortie qui est de 400 mA par volt.

2.3.2.2. Carte d'acquisition/stimulation.

Le choix de cette carte a été fait en prenant en compte les contraintes imposées par le type de mesures désirées. La carte devait être capable de manière synchronisée :

- De générer un signal analogique de fréquence égale à 100 kHz pour obtenir des impulsions d'une période de 20 µs.
- De réaliser l'acquisition simultanée du signal de stimulation et de la réponse cellulaire.

Sachant qu'entre toutes les réponses cellulaires, le potentiel d'action était le plus rapide, nous avons basé notre sélection sur les critères de ce dernier.

a. Le potentiel d'action.

Un potentiel d'action a une durée totale de l'ordre de 30 ms. La partie la plus caractéristique du signal correspond au pic d'amplitude maximum d'une valeur de quelques millivolts et d'une durée de 2 ms (Figure 25).

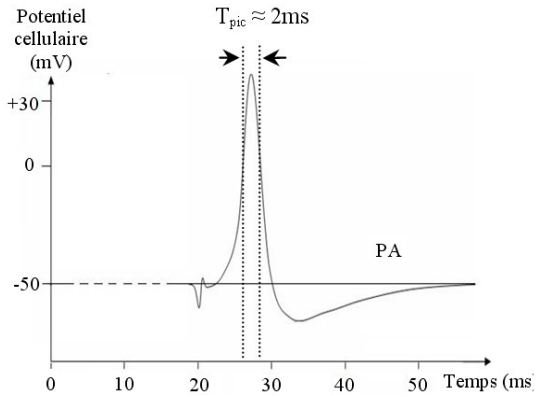


Figure 25 : Allure d'un potentiel d'action.

b. Fonction acquisition.

Cette carte permet de réaliser l'acquisition de deux voies tout en générant un signal analogique de commande. L'acquisition des deux voies n'est pas réalisée en simultané mais à une fréquence de balayage connue correspondant à la fréquence d'échantillonnage maximum des entrées analogiques divisé par le nombre de voies d'entrée utilisées. Dans notre cas, l'utilisation de deux voies d'acquisition impose à chacune d'elles une fréquence d'échantillonnage maximum de 125 kHz et un décalage de scrutation de 8 µs entre elles.

Sachant que le pic maximum au cours d'un potentiel d'action a une durée de 2 ms, une fréquence d'échantillonnage de 125 kHz permet d'obtenir 250 échantillons durant ce laps de temps. Ce nombre est largement suffisant pour notre application. De plus, le décalage temporel de 8 µs existant entre les deux voies au cours de l'échantillonnage est négligeable par rapport au temps de latence attendu entre le signal de stimulation et la réponse cellulaire. Les conditions générales d'acquisition conviennent donc à notre application.

c. Fonction génération d'une sortie analogique.

Le laser doit être capable d'envoyer des impulsions allant de dix microsecondes à la seconde. La fréquence maximum de la sortie analogique de 833 kHz permet d'obtenir un échantillon toute les 1,2 µs. Cette précision permet tout à fait la création d'impulsions de l'ordre de la dizaine de microsecondes. La carte d'acquisition et génération de signal 6221 permet de contrôler entièrement les paramètres du signal de commande à envoyer (amplitude et fréquence). Cette carte est ainsi conforme au cahier des charges imposées et permet bien :

- De réaliser l'acquisition simultanée du signal de stimulation et de la réponse de la cellule.
- De générer un signal de commande permettant de moduler en tension la source de courant continu.

2.3.2.3. Programme de commande avec le logiciel LabVIEW.

Le programme réalisé possède, via une interface utilisateur, plusieurs fonctionnalités. Il permet de :

- Rentrer les paramètres désirés du signal de modulation (fréquentiel, amplitude),
- Rentrer le nom et le chemin du fichier à sauvegarder,
- Configurer la source de courant dans le mode adéquat et commander sa sortie par la carte GPIB,
- Générer le signal de modulation de la source de courant continu,
- Réaliser l'acquisition du signal de stimulation (aux bornes du laser) et du signal biologique (sur l'amplificateur de la station patch clamp pour les tests in vitro ou celui du banc PEV pour les tests in vivo),

- Visualiser les résultats en temps réel et mesurer les temps de décalage entre les deux signaux.

Ce programme est conçu pour fonctionner avec les bancs de test in vitro et in vivo. Suivant la méthode sélectionnée, seul le déroulement de certaines fonctions spécifiques du programme se modifie automatiquement. La logique du programme correspondant à la commande du laser reste identique pour les trois configurations (Figure 26).

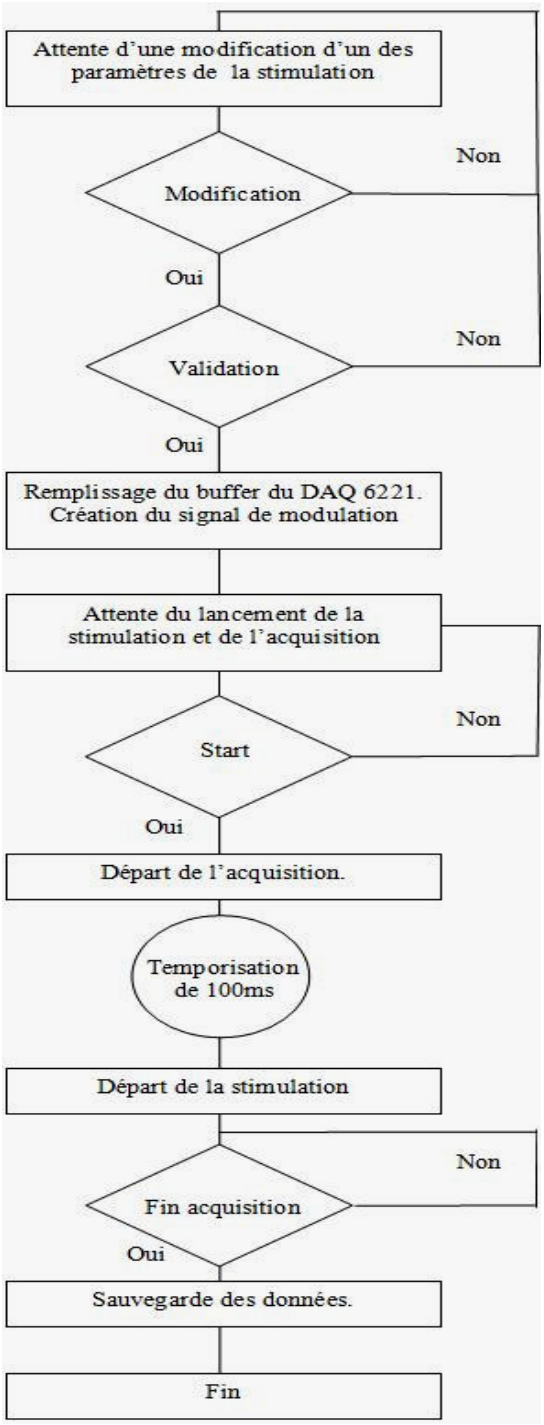


Figure 26 : Chronogramme du fonctionnement général du programme de commande du banc de test.

a. Interface utilisateur : onglet « information générale ».

Cette partie de l'interface permet de choisir le test et les conditions dans lesquelles on souhaite le réaliser. La manipulation de ces outils virtuels configure les paramètres de sauvegarde en définissant l'entête du fichier de sauvegarde (Figure 27). Il permet également de choisir le banc de test utilisé en précisant la technique et la longueur d'onde du laser employé.

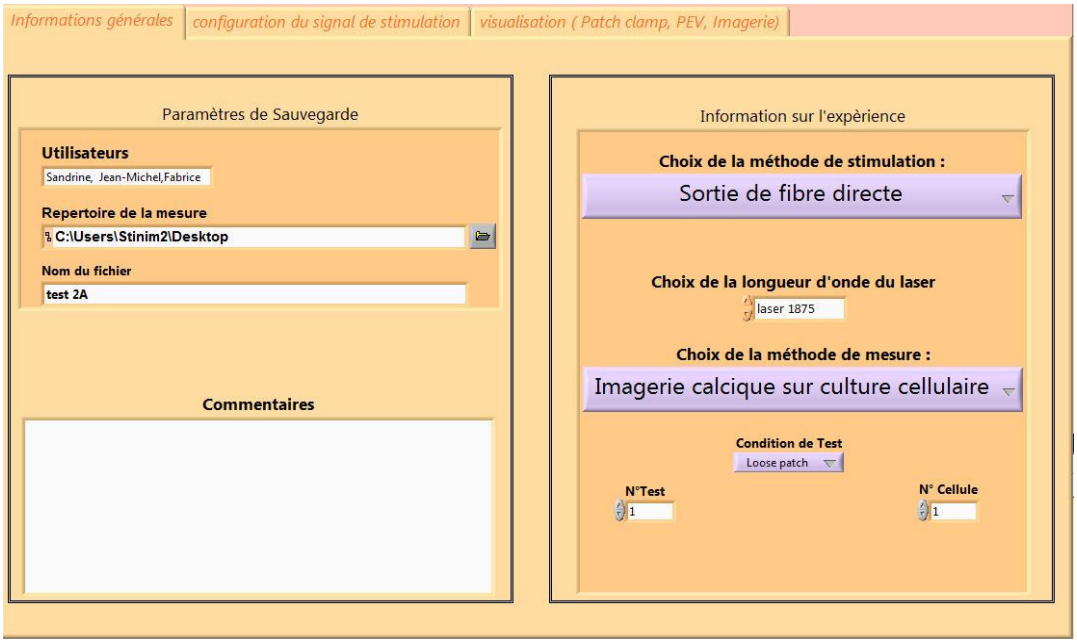


Figure 27 : Interface utilisateur des paramètres de sauvegarde et du choix du banc de test.

Les choix opérés dans cet onglet permettent un fonctionnement ciblé du programme. Si certains éléments ne sont là qu'à titre indicatif, certains jouent un rôle déterminant dans le déroulement général du programme. Par exemple, si l'on travaille sur le poste patch clamp, l'acquisition des deux voies d'acquisition sera validée. Au contraire, pour les tests d'imagerie, seul le signal de stimulation sera enregistré. Le choix de la longueur d'onde permettra de faire apparaître cette information sur le fichier de sauvegarde et sera également pris en considération pour le calcul de la densité d'énergie efficace au niveau de la cellule visée.

b. Interface utilisateur : onglet de « configuration du signal de stimulation ».

Pour une bonne compréhension de la suite de la thèse, il est important de détailler le vocabulaire employé pour le signal de stimulation. Une stimulation correspond à une ou

plusieurs impulsions. Le choix du nombre d'impulsion et de leur durée, donne le temps de stimulation global. Au cours du test, l'utilisateur peut choisir de réaliser plusieurs stimulations. Il suffit de notifier le temps souhaité entre chaque stimulation et le nombre de répétition. (Figure 28). L'amplitude du signal n'excède pas 10V conformément à la limitation imposée par la source de courant qui est de 1V/400mA.

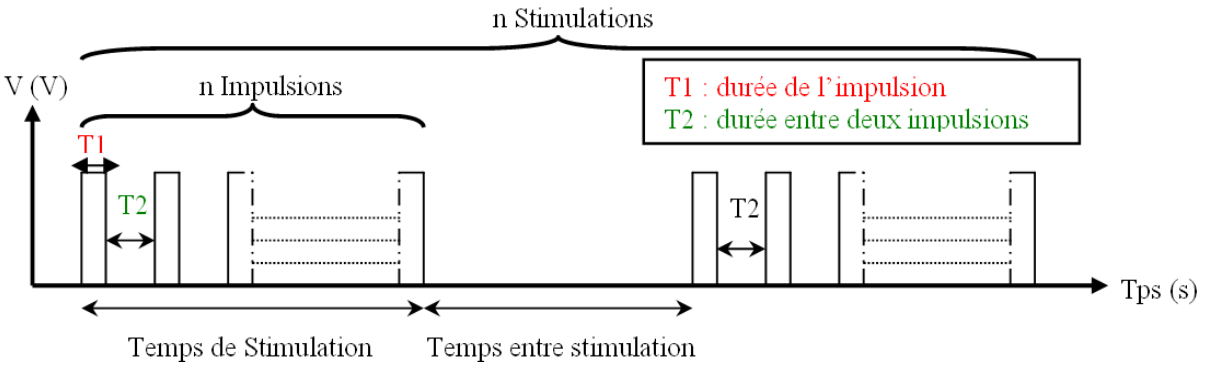


Figure 28 : Descriptif du signal de commande de la source de courant.

L'onglet de l'interface utilisateur permettant la sélection du signal de stimulation reprend le vocabulaire détaillé ci-dessus et permet de paramétrer chaque élément le composant en remplissant les champs correspondants (Figure 29).

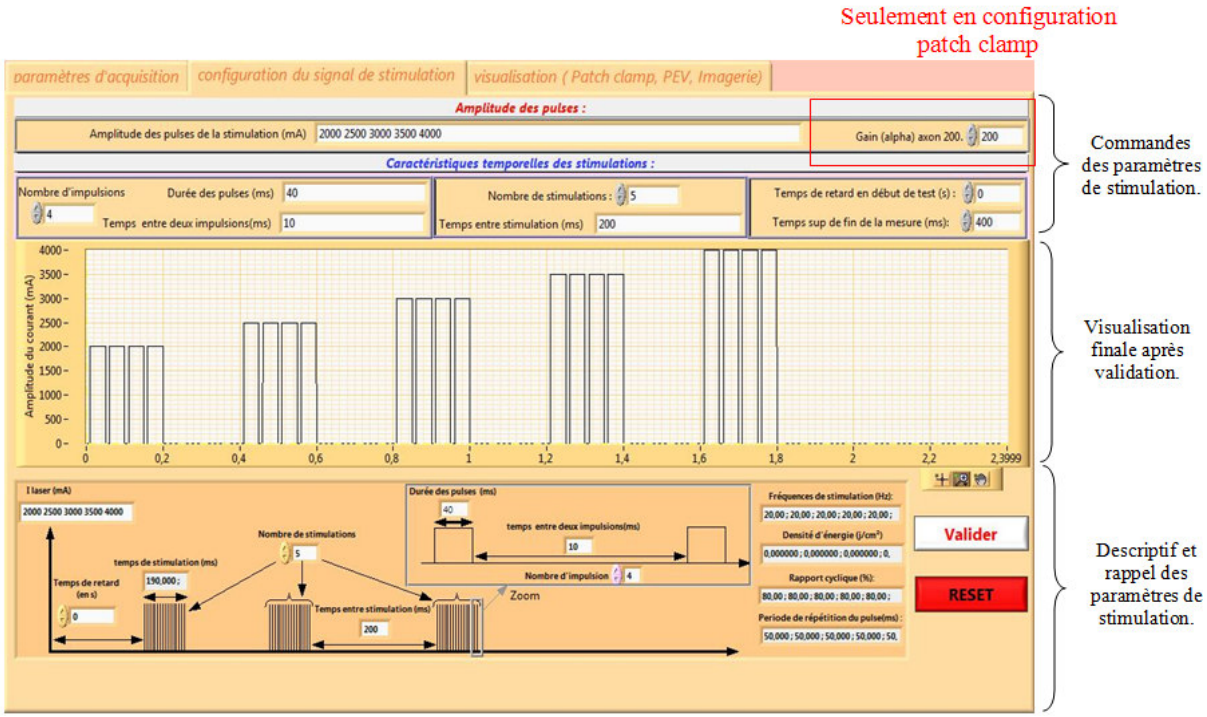


Figure 29 : Interface utilisateur de l'onglet de sélection du signal de stimulation.

Une fois ces choix effectués, l'utilisateur doit valider sa sélection. Cette validation lance la configuration de la source de courant et le remplissage du buffer de la carte d'acquisition/génération servant à la création du signal de modulation. À partir de cette étape, le système est en attente du signal de départ du test.

c. Interface utilisateur : onglet de « visualisation (patch clamp, PEV, Imagerie ».

Le troisième onglet « visualisation» (Figure 30) permet de lancer le test et d'observer le (les) signal (aux) obtenu (s) avant, pendant et après la stimulation optique.

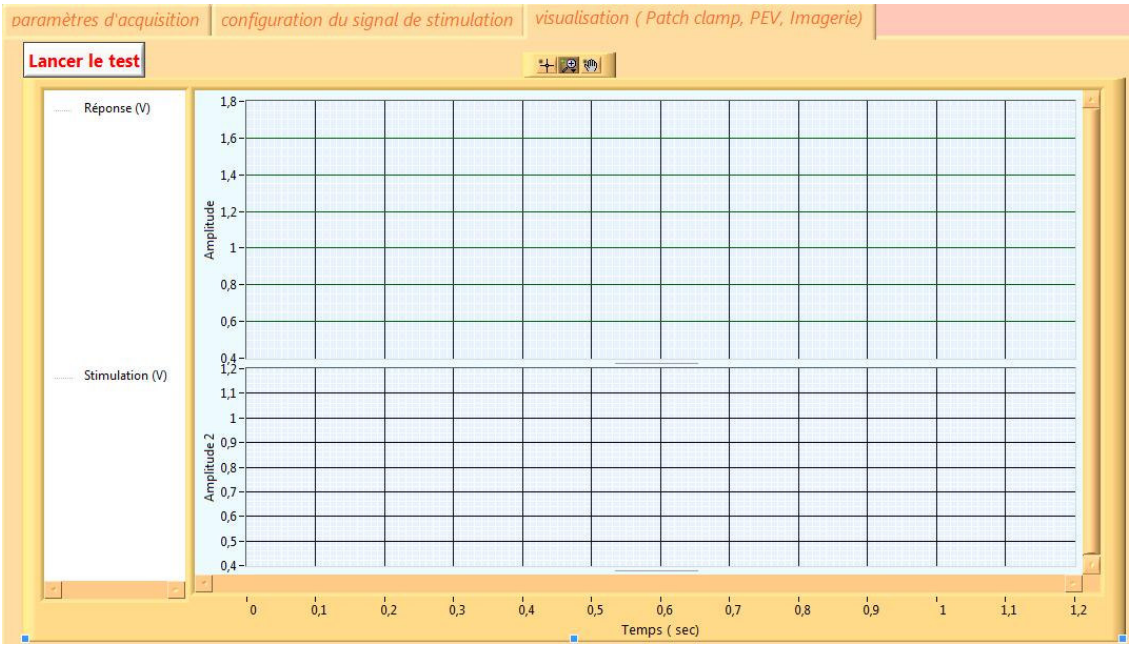


Figure 30 : Interface utilisateur de l'onglet de visualisation du signal de stimulation et de réponse biologique.

Pour plus de simplicité, ce programme servira pour tous les bancs de mesure disponibles pour nos expériences, qu'il s'agisse d'in vivo ou d'in vitro.

Les différences à noter sont :

- Pour les tests sous station patch clamp, l'utilisateur devra rentrer la valeur du gain utilisé sur le boîtier amplificateur de signaux AXON 200.

- Contrairement aux tests patch clamp et PEV, l'acquisition de la réponse biologique n'est pas réalisée en imagerie de fluorescence calcique. Seul le signal de stimulation sera affiché et sauvegardé.

À chaque fin de test, un fichier de sauvegarde est généré. Celui-ci est composé d'un en tête où figurent toutes les informations inscrites dans les onglets « sauvegarde » et « configuration du signal de stimulation ». À la fin du test, il vient s'y ajouter sous forme de colonnes distinctes, le ou les voies d'acquisitions et le temps.

2.3.3. Les bancs de tests in vitro.

2.3.3.1. Imagerie calcique.

Le travail d'adaptation devait permettre la stimulation de la zone observée sous l'objectif 60X du microscope de fluorescence biphotonique. La taille du champ visuel obtenu avec l'objectif étant de 260 µm de diamètre, nous devions contenir et focaliser notre stimulation dans cette limite. Dans ces conditions, le plus logique aurait été d'emprunter le chemin optique du microscope. Cette solution permettrait de stimuler précisément la zone observée de façon perpendiculaire avec une épaisseur d'eau connue et constante de deux millimètres qui correspond au point de focalisation de l'objectif. Malheureusement, le système d'imagerie actuel occupe deux des trajets optiques du microscope (laser et caméra) et en l'état, ne permet pas l'utilisation d'un troisième. Ne pouvant pas passer au travers de l'objectif, il ne restait plus que la solution consistant à passer par-dessous (Figure 31).

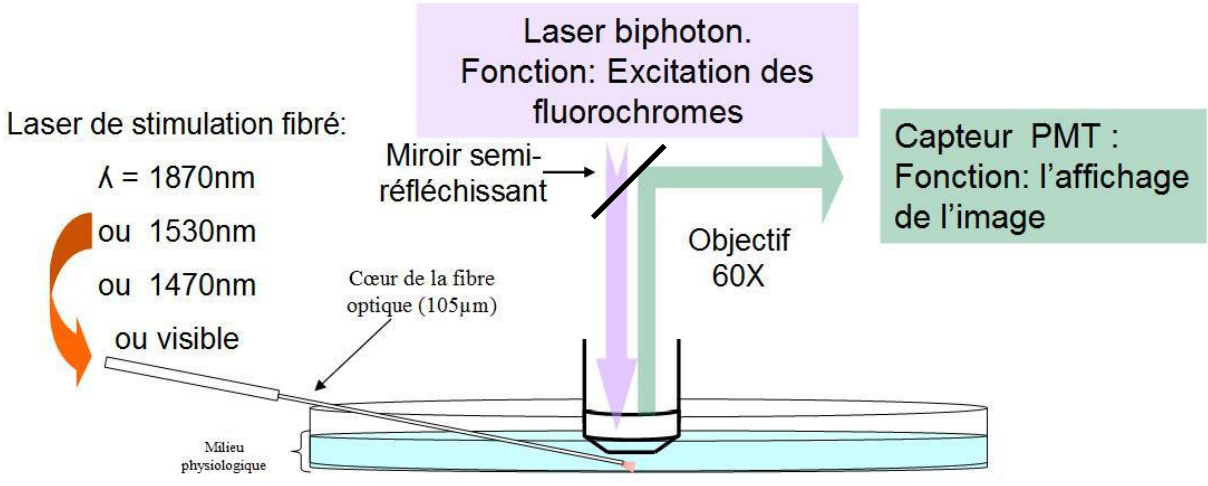


Figure 31 : Principe de fonctionnement du banc d'imagerie calcique avec stimulation optique.

La méthode d'excitation employée pour le test d'imagerie de fluorescence calcique consiste à utiliser une fibre optique de 105 µm. Une extrémité de la fibre est raccordée par connecteur SMA en sortie de fibre du laser sélectionné, l'autre est préalablement coupée, dénudée et polie avant d'être placée sous l'objectif. Le placement par micromanipulateur est réalisé en visuel en utilisant une lumière visible de guidage injectée dans la fibre qui permet d'approcher la fibre à une centaine de micromètres de la cible (Figure 32)

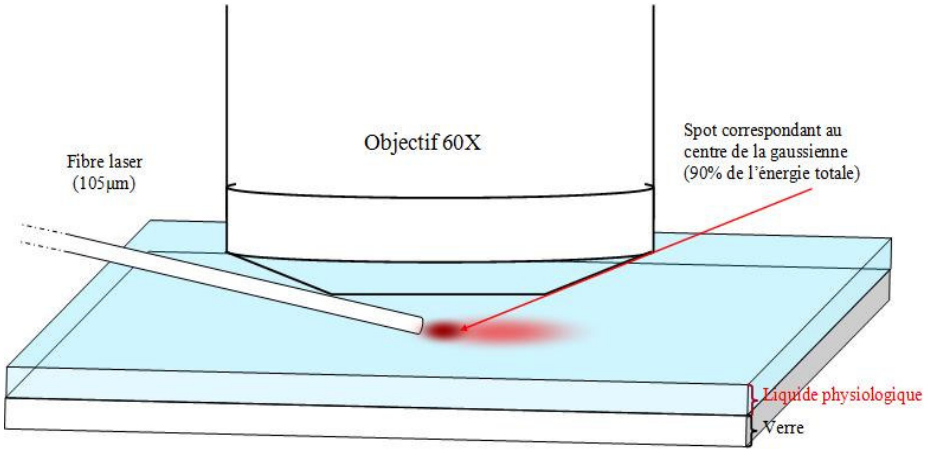


Figure 32 : Représentation de la distribution surfacique de l'énergie du faisceau laser.

Le faisceau arrive donc de façon non perpendiculaire sur le tissu, et la zone éclairée est plus étendue. L'épaisseur d'eau fixe de deux millimètres et la forme géométrique de l'objectif nous donnent un angle d'insertion maximum de 20 ±2 °. Ces conditions donnent en sortie de fibre un spot de forme ellipsoïdale de 2 mm sur 170 µm. Néanmoins, la forme gaussienne du signal concentre 80 % de l'énergie totale sur une surface d'une centaine de micromètres. Au cours du placement de la fibre, c'est cette zone que l'on vient positionner sur les cellules à tester.

2.3.3.2. Station patch clamp.

a. Méthodes de guidage du faisceau laser.

La méthode de stimulation optique utilisée actuellement sur le banc de test d'électrophysiologie est identique à celle employée pour les tests en imagerie de fluorescence

calcique (Figure 33). La difficulté supplémentaire par rapport à l'imagerie de fluorescence, réside en la fragilité du contact entre l'électrode de mesure et la cellule.

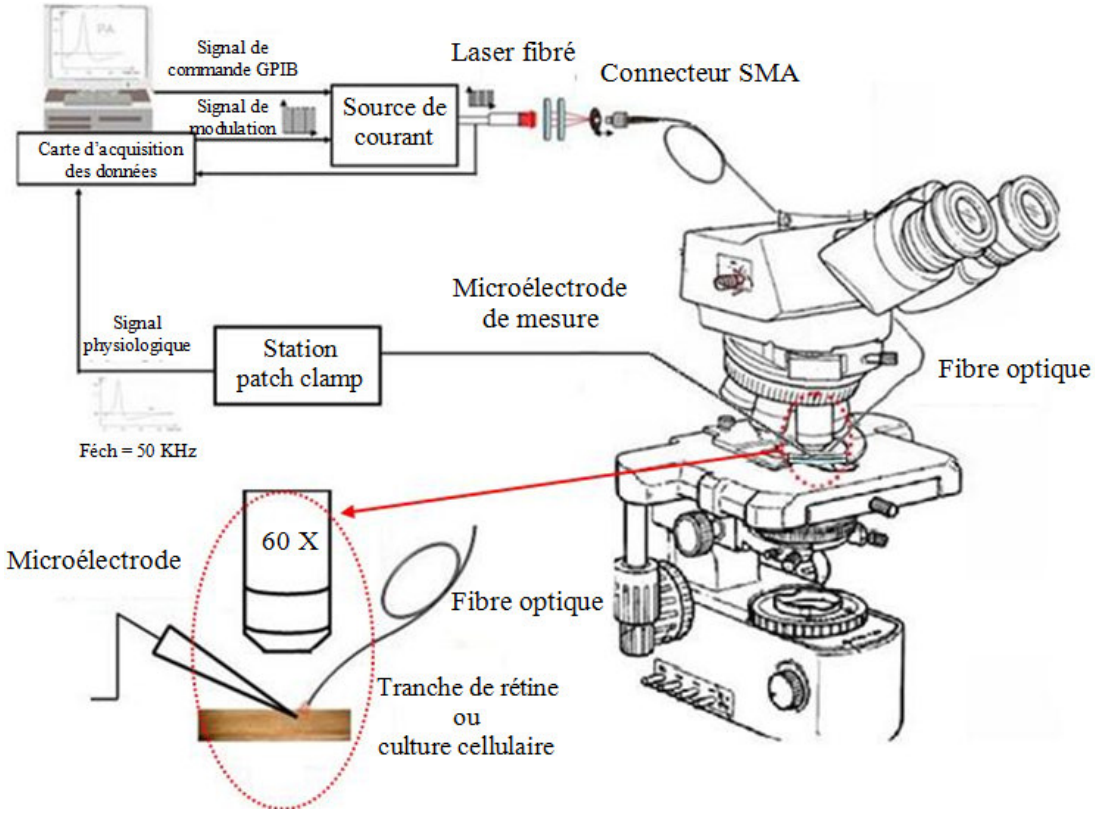


Figure 33 : Banc de mesure in vitro et de stimulation directe par fibre optique.

La mise en place du test doit être exécutée en trois étapes successives. Premièrement, se placer sous le microscope sur la zone à tester. Deuxièmement, positionner la fibre de manière à éclairer la zone observée. Troisièmement, placer l'électrode de mesure sur la cellule.

Afin de s'affranchir des problèmes lors du positionnement de la fibre, et ainsi rendre plus pratique et fiable notre excitation, nous avons mis au point une autre technique d'adaptation de notre laser au microscope utilisé pour la mesure par patch clamp. Il s'agit d'emprunter le chemin optique du microscope pour venir stimuler la zone située au point focal de l'objectif de manière perpendiculaire. Malgré l'inconvénient d'une absorption beaucoup plus importante due à l'épaisseur d'eau que le faisceau doit traverser avant d'arriver à la cellule, cette méthode présente des avantages certains. Elle permettra d'obtenir une grande précision pour le ciblage de la zone à exciter. De plus, la surface le point de focalisation de l'objectif étant très petit, la densité d'énergie déposée par unité de surface sera plus élevée que dans le cas d'une stimulation directe en sortie de fibre.

La solution qui a été choisie consiste à garder notre système déporté à fibre optique utilisé en stimulation directe et à venir l'adapter sur le microscope. Le boîtier d'éclairage complémentaire ainsi que son trajet optique ont été complètement démontés et ont été remplacés par une pièce usinée. Cette pièce sert de guide à un ensemble optique permettant de centrer et rendre parallèle le faisceau laser en sortie de fibre (Figure 34).

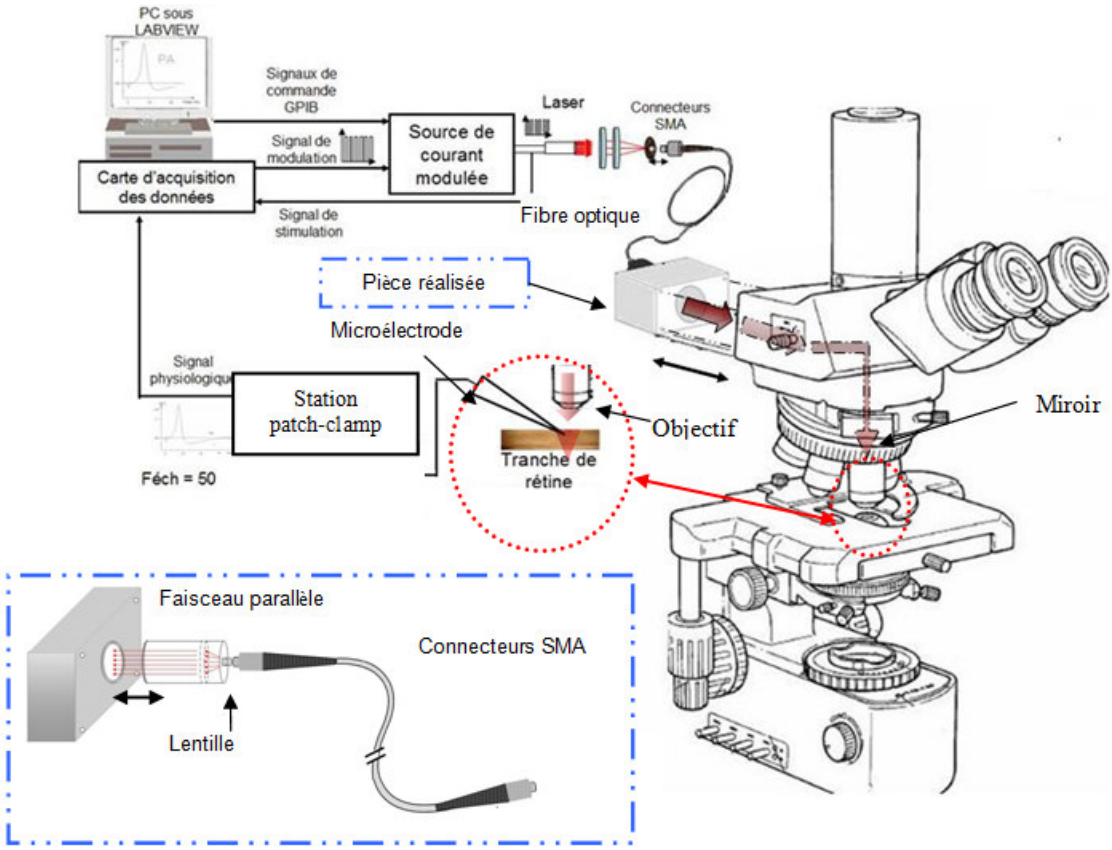


Figure 34 : Banc de mesure in vitro en empruntant le chemin optique du microscope.

L'adaptation mécanique terminée, une étude sur la compatibilité optique entre notre longueur d'onde et les éléments optiques en place a été réalisée. Cette étude est obligatoire, car si l'utilisation d'un tel microscope est garantie dans le spectre visible, un fonctionnement équivalent dans le proche ou moyen infrarouge n'est pas garanti. Les caractérisations réalisées portent sur les deux éléments se trouvant sur le trajet optique faisceau, à savoir le miroir et l'objectif. Pour chaque série de mesure, une mesure préalable est réalisée pour vérifier la puissance optique en sortie de fibre qui servira de référence.

b. Caractérisation des pertes au niveau du miroir.

Pour réaliser cette mesure, un montage adapté a été réalisé pour pouvoir venir placer un détecteur directement sous l'objectif du microscope. Les mesures réalisées ont permis d'obtenir l'absorption totale du microscope comprenant l'ensemble miroir plus objectif pour une longueur d'onde de 2.2 µm (Figure 35).

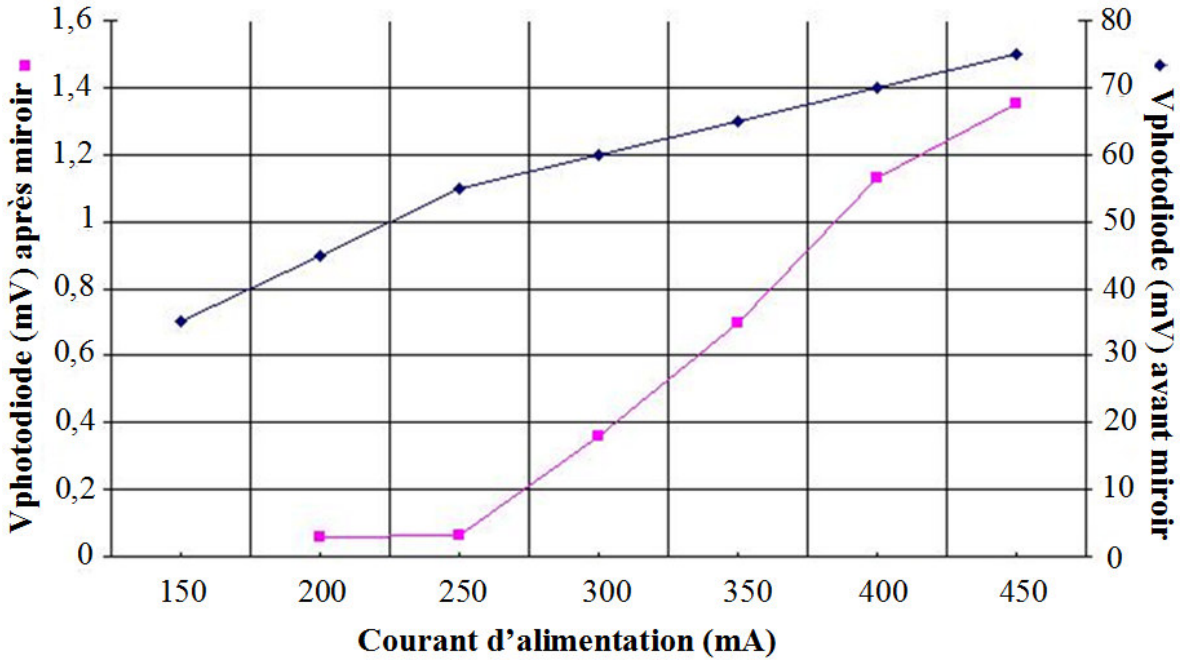


Figure 35 : Valeurs de puissance calculées en sortie du miroir.

Les mesures montrent après calcul qu'une absorption moyenne de 80 % du signal est à prendre en compte en sortie du miroir. La solution utilisée a été de le remplacer par un miroir à surface en or qui reflète à 100 % le signal de nos lasers. Un bloc original a été usiné pour l'occasion (Figure 36).

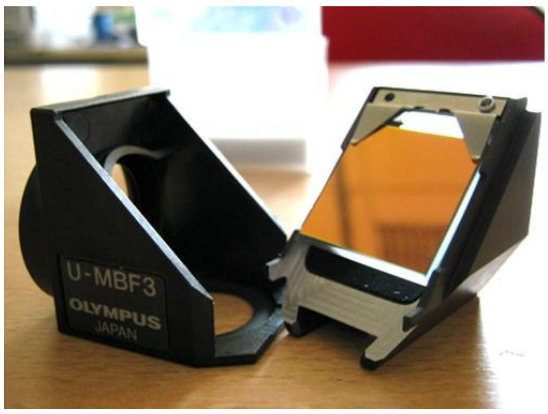


Figure 36 : Bloc Olympus après usinage avec son nouveau miroir à surface en or.

Même si les pertes au niveau du miroir sont négligeables, il est très important de quantifier l'énergie exacte obtenue en sortie de la fibre optique, ou de l'objectif du microscope pour chaque laser. Des mesures ont été réalisées afin de répertorier le pourcentage de pertes à chaque étape du trajet optique.

c. Caractérisation des pertes en sortie du microscope pour chaque longueur d'onde.

Nous avons fait l'étude des pertes de puissance de chaque laser en sortie de l'objectif du microscope. Pour réaliser cette mesure, un détecteur de puissance à thermopile (PM10 Coherent Power max) est placé sous l'objectif 60X du microscope (Figure 37).

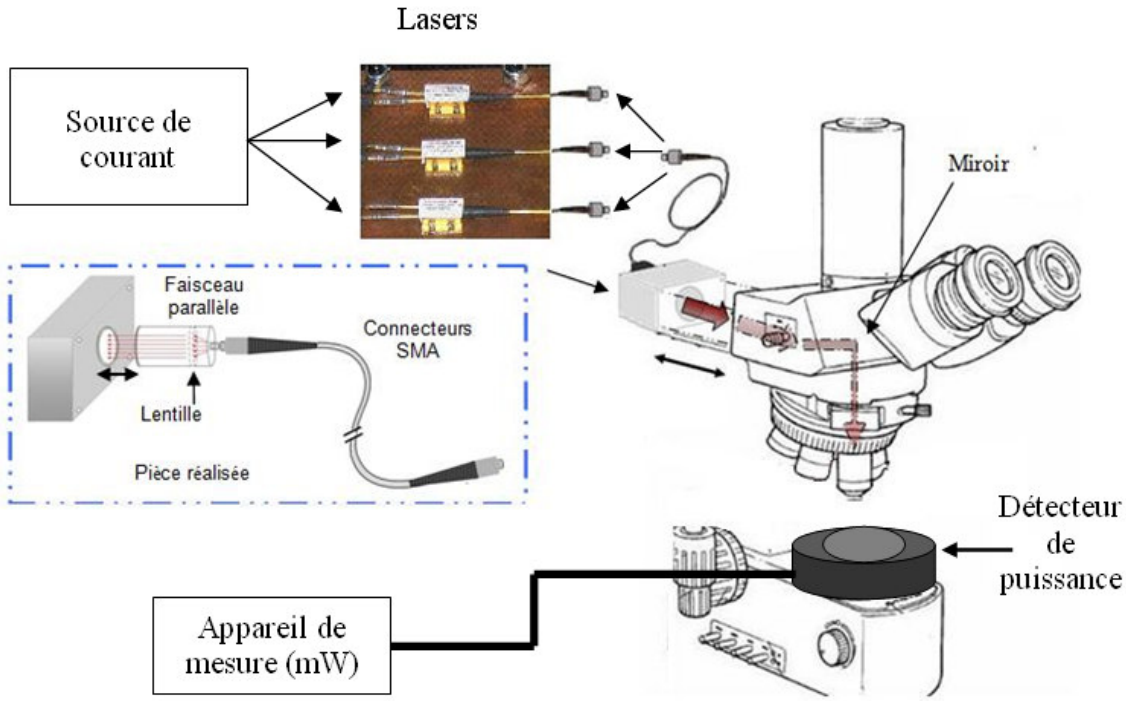


Figure 37: Montage de caractérisation de l'absorption totale du trajet optique du microscope.

La mesure a été effectuée pour les trois lasers (Figure 38, Figure 39 et Figure 40).

L'axe intitulé $P_{détecteur}$ de référence (mW) correspond à la puissance mesurée avant le microscope.

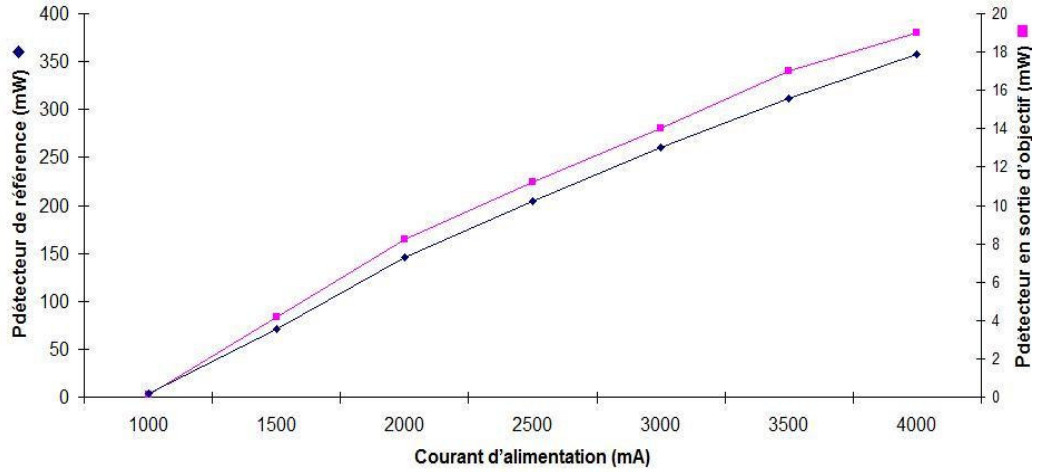


Figure 38: Absorption du trajet optique du microscope pour le laser de 1875 nm.

La valeur moyenne des pertes dans le microscope pour le laser à 1875 nm est de 94,6 %.

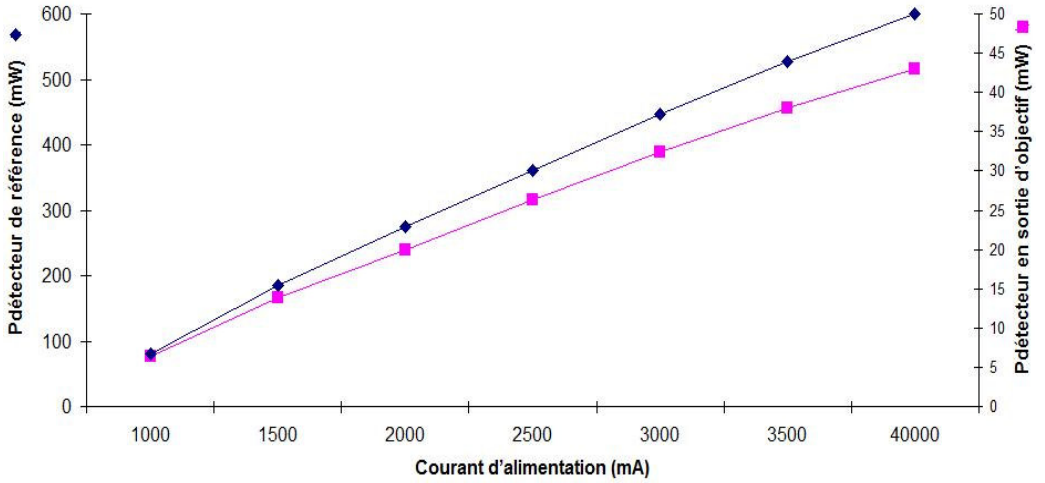


Figure 39: Absorption du trajet optique du microscope pour le laser de 1530 nm.

La valeur moyenne des pertes dans le microscope pour le laser à 1530 nm est de 92,8 %.

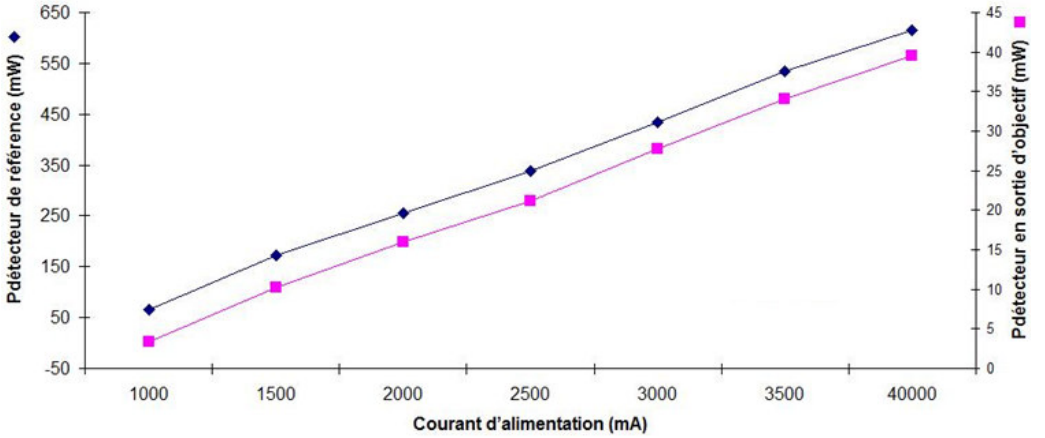


Figure 40 : Absorption du trajet optique du microscope pour le laser de 1470 nm.

La valeur moyenne des pertes dans le microscope pour le laser à 1470 nm est de 93,5 %.

L’absorption trop importante du faisceau lumineux rend l’utilisation de ce système inefficace pour notre application. La solution consisterait à utiliser un objectif adapté au microscope et compatible avec la gamme de longueur d’onde souhaitée.

d. Utilisation du microscope inversé.

Au cours de la mise en place du banc de mesure électrophysiologique sur le microscope, il a été constaté des difficultés liées à la configuration physique du microscope. En effet, l’espace réduit laissé sous l’objectif ne facilite, ni le placement de l’électrode de mesure, ni le placement de la fibre optique. Afin de faciliter l’accès aux cellules pour l’électrode et la fibre, le choix s’est porté sur l’utilisation d’un microscope inversé qui offre un accès plus aisé (Figure 41).

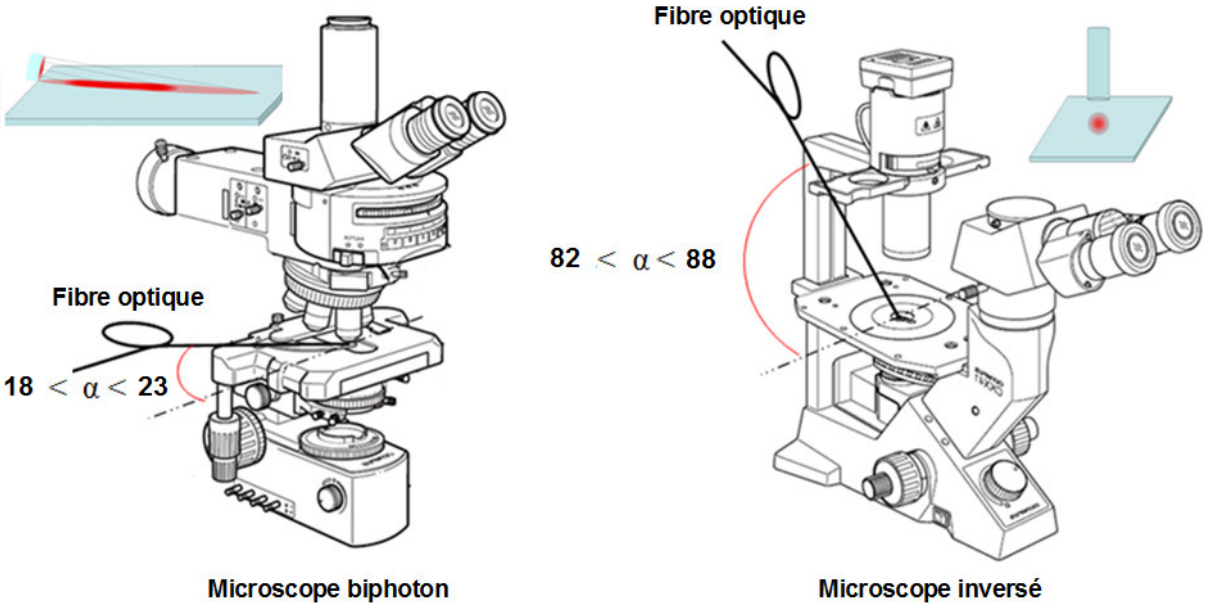


Figure 41 : Différence de mise en place de la fibre entre le microscope de fluorescence biphotonique et le microscope inversé.

2.3.4. Le banc de test in vivo.

La première difficulté rencontrée dans l’élaboration du banc de mesure a été de trouver un moyen de venir exciter la rétine de l’animal avec notre laser. En effet, l’œil de la souris est composé de plusieurs couches consécutives traversées par la lumière dans l’ordre suivant: la

cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré. Chacune d'elle possède une absorption propre dans la gamme de longueurs d'onde infrarouges rendant impossible une excitation extra oculaire avec notre laser. La solution adoptée est d'approcher la stimulation lumineuse au plus près de la rétine en traversant les différentes couches au moyen d'une fibre optique. Notre objectif est d'obtenir un faisceau lumineux d'énergie suffisante pour l'excitation des cellules visées.

Nous savons que dans une stimulation standard par flash, 25% de la rétine doit être stimulée pour pouvoir obtenir une mesure fiable au niveau du cortex cérébral. En est-il de même pour une stimulation laser ? Si oui, nous devrons prévoir la possibilité d'exciter une zone plus étendue tout en gardant un niveau d'énergie suffisant. Enfin, concernant le système d'acquisition, il devra permettre, de connaître avec précision le délai entre la réponse mesurée et le début de la stimulation.

2.3.4.1. Adaptation de la fibre optique sur une aiguille.

La solution retenue est le couplage du laser avec une fibre optique qui pourra être introduite dans la cavité optique de l'animal et placée au plus près de la zone de la rétine choisie. La surface de l'œil étant assez rigide et notre fibre optique fragile (cœur à nu), nous avons introduit cette dernière à l'intérieur d'une aiguille (Figure 42).

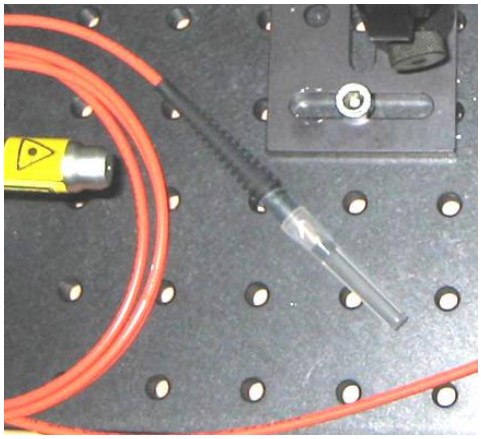


Figure 42 : Adaptation de la fibre optique sur une aiguille.

De cette manière, nous nous assurons que la fibre sera facilement insérable dans l'œil tout en étant protégée. Chaque fibre a été préalablement coupée, dénudée, polie avant d'être introduite et collée dans l'aiguille de diamètre adapté.

2.3.4.2. Récupération et acquisition du signal de synchronisation.

Pour adapter notre système sur le matériel de mesure en place à l'INM, nous avons remplacé le caisson de stimulation du montage initial par notre propre stimulateur optique fibre infrarouge. Les trois éléments du système de mesures de l'INM ne peuvent pas être débranchés les uns des autres. Le caisson de stimulation par flash restera branché, mais ne remplira plus sa fonction de stimulateur. Pour que ce changement soit valable, notre système doit réaliser l'acquisition synchrone du signal en sortie de l'ampli et du signal de stimulation afin de connaître avec précision le temps de latence de la réponse.

Au départ, nous n'avons pas eu connaissance ni du brochage du câble de connexion reliant l'amplificateur de signal à l'ordinateur, ni de l'amplitude des signaux que nous voulions mesurer. Un travail conséquent a donc été mis en œuvre pour localiser et identifier les signaux afin d'isoler et de mesurer les deux broches de sortie correspondant aux voies de mesure gauche et droite de l'amplificateur. Le fait de prendre en compte les deux voies de sortie nous permettra de réaliser des tests d'électrorétinogramme (ERG) pour vérifier l'activité des photorécepteurs que ce soit dans le cas de souris valides ou de souris RD10 (cf. chapitre 1).

Le programme permet de moyenner en temps réel le signal reçu à chaque stimulation afin de pouvoir observer les résultats. Le matériel d'acquisition et de commande du laser reste identique à celui utilisé dans le cadre du test in vitro (Figure 43).

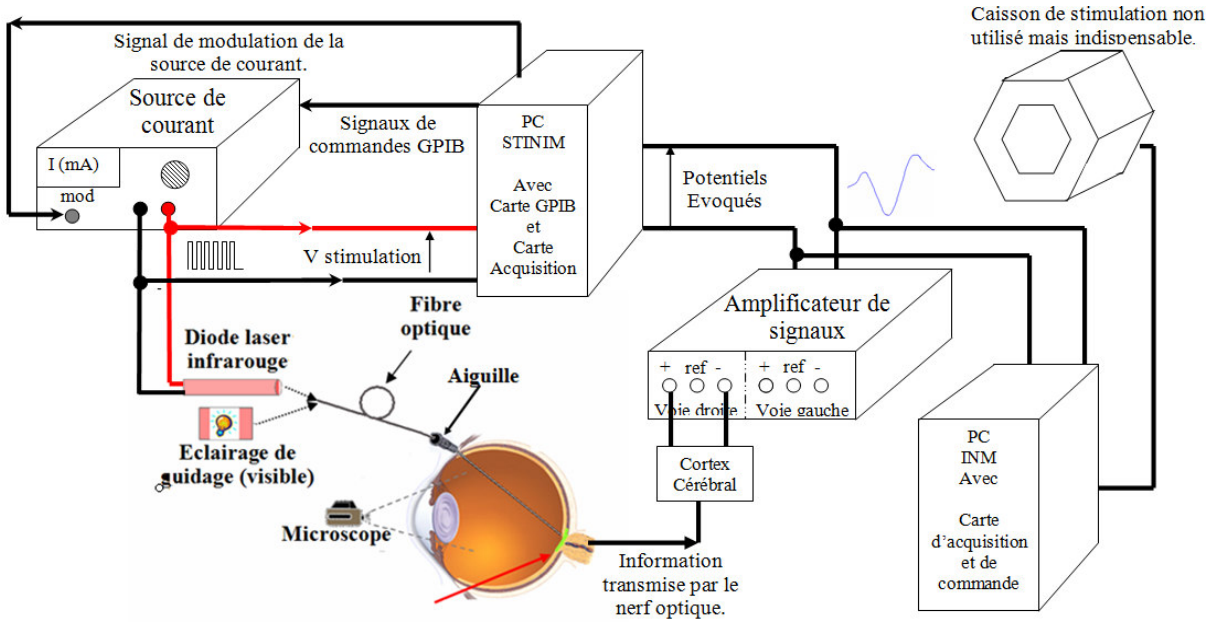


Figure 43: Vue d'ensemble du banc de mesure in vivo adapté.

L’acquisition synchronisée des deux voies d’acquisition (à 10 µs près) permettra de mesurer avec précision le temps de latence observé entre le début de la stimulation et la réponse du cerveau.

Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre l'ensemble du travail réalisé pour la conception des différents bancs de stimulation.

Le choix de la longueur d'ondes des lasers a été réalisé suivant deux critères, leur coefficient d'absorption dans l'eau et leur puissance. Les lasers de 1470 nm et 1875 nm nous permettront d'étudier deux longueurs d'onde possédant sensiblement le même coefficient d'absorption, avec le premier permettant d'atteindre le double de puissance que le second. Le laser à 1535 nm a été choisi pour étudier l'effet d'un laser possédant un coefficient d'absorption plus faible que les deux autres. Il s'agit dans les trois cas de diodes laser de puissance fibrées dont les caractéristiques techniques ont été vérifiées.

Un travail de programmation a été réalisé afin de faciliter la création du signal de stimulation avec les paramètres désirés pour le test. Cette application permet la commande en modulation en fréquence de la source de courant et assure les fonctions d'acquisition, d'affichage et de sauvegarde des signaux de commande et de stimulation.
Les lasers sont placés sur un banc optique auquel a été ajouté un laser de lumière visible prévue pour faciliter le placement la fibre sur la zone ciblée.

La dernière partie consistait à adapter notre système de stimulation sur des bancs de mesures biologiques initialement dépourvus de voies d'entrée prévues à cet effet. Si ces adaptations ont souvent buté sur des barrières technologiques, ce travail a finalement été réalisé sur les deux bancs de mesure utilisés pour les tests in vitro et aussi sur le banc de mesure des PEV en prévision des tests futurs in vivo. Dans chacun des cas, le faisceau lumineux est guidé via une fibre optique avec un cœur de 105 µm, dont la mise en place varie suivant le microscope et le modèle biologique utilisé.
Cette variation du positionnement de la fibre selon les types de tests a été identifiée et prise en considération lors de l'estimation de l'énergie reçue par les cellules pendant les tests.
La répartition de l'énergie du faisceau laser au niveau des cellules et les résultats obtenus avec les bancs de mesure sont détaillés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Résultats.

Introduction

Ce troisième chapitre présente les résultats obtenus avec les techniques de mesures d'imagerie de fluorescence calcique et d'électrophysiologie et apporte la démonstration que le banc de stimulation laser permet d'obtenir des réponses biologiques.

Ce chapitre présente tout d'abord une évaluation de l'énergie reçue par le neurone au cours des tests. Comme il est indiqué dans le chapitre 2, le placement de la fibre qui permet l'excitation laser est différent suivant la technique de mesure utilisée. Cette différence dans le placement a une influence directe sur la répartition de l'énergie dans le faisceau lumineux projeté. Cette partie présente donc les résultats de simulation qui nous permettra de quantifier les seuils d'énergie de stimulation au niveau de la cellule en prenant en considération la longueur d'onde et les paramètres de positionnement des différents éléments de chaque banc de stimulation.

Nous détaillons ensuite les résultats obtenus en imagerie de fluorescence calcique et en électrophysiologie sur les cultures cellulaires de l'appareil vestibulaire, de la rétine et sur tranche de rétine. Nous présentons les seuils d'énergie de stimulation pour chacune des trois longueurs d'ondes, et nous montrons l'impact des paramètres du signal de stimulation et du positionnement de la fibre.

3.1. Estimation de l'énergie reçue par le neurone.

La mise en œuvre d'une excitation optique d'un neurone implique de maîtriser l'énergie qu'on lui envoie. Dans notre cas, il s'agit d'abord de connaître l'énergie délivrée par nos lasers en sortie de fibre afin de pouvoir ensuite déterminer l'énergie reçue par la cellule visée. L'énergie de sortie dépend de la puissance optique du laser et du temps de stimulation. Pour les tests, nous avons utilisé la source de courant entre 2 et 3,5 A sur chacun des trois lasers. Les valeurs mesurées des puissances délivrées en sortie de fibre pour chaque laser sont données dans le tableau 1. A titre d'exemple, l'énergie en sortie de la fibre de positionnement (rallonge) pour un temps de stimulation de 20 ms est donnée pour chaque puissance.

Laser	λ = 1875 nm		λ = 1470 nm		λ = 1530 nm	
I_{source} (mA)	$P_{optique}$ (mW)	Energie (mJ) *	$P_{optique}$ (mW)	Energie (mJ)*	$P_{optique}$ (mW)	Energie (mJ)*
2	110	2,2	230	4,6	230	4,6
2,5	150	3	310	6,2	300	6
3	190	3.8	390	7,8	370	7,4
3,5	230	4,6	450	9	430	8,6

Tableau 1 : Récapitulatif des puissances délivrées par chaque laser en sortie de la fibre de positionnement. *Un exemple de calcul d'énergie est donné pour un temps de stimulation de 20 ms.

3.1.1. Forme du signal en sortie de fibre.

Une information importante est la distribution de l'énergie du faisceau lumineux en sortie de fibre. Des mesures réalisées avec l'équipe NANOMIR de l'IES ont permis de relever une caractéristique de forme gaussienne (Figure 1).

Le spot lumineux étant projeté suivant un angle et une distance connus, la répartition gaussienne de l'énergie doit être prise en considération pour le calcul de la densité d'énergie reçue par la cellule.

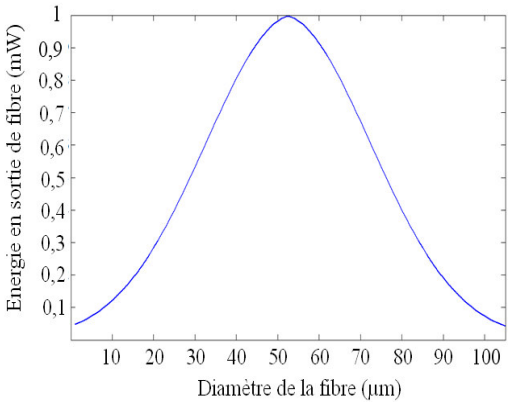


Figure 1 : caractéristique unitaire de la distribution de l'énergie en sortie d'une fibre de 105 µm de cœur.

3.1.2. Position de la fibre.

Le placement de la fibre varie d'une technique de mesure à l'autre. Son angle d'incidence avec le milieu cellulaire change considérablement la forme du faisceau projeté. Les mesures électrophysiologiques sur des cellules par la technique du patch clamp sont réalisées sur un microscope inversé qui permet un placement plus aisé de la fibre. Pour ces tests, la fibre optique est insérée avec un angle d'inclinaison de 85° ± 3° dans le bain. Afin de connaître avec précision la distance de la fibre par rapport à la cellule, la calibration des micromanipulateurs du microscope a été réalisée pour chacun de ses axes en utilisant une lame de verre de microscope de dimensions connues. La calibration de l'axe z correspond à la mesure du nombre de tours et de divisions nécessaires pour passer du plan focal du fond de la boite à celui correspondant à la surface du dessus de la lame, soit 6 tours = 600 divisions = 1 mm. Cette calibration nous a permis de réaliser des tests avec une fibre placée entre 130 µm et 200 µm des cellules selon l'axe z. Dans ces conditions, le spot lumineux gardera une forme circulaire et un diamètre correspondant à la divergence de la fibre et à sa distance avec la zone visée. Afin de laisser un espace suffisant pour le placement de l'électrode de mesure, la cellule doit être placée en périphérie du spot lumineux projeté. La calibration en x et y et la lumière visible injectée dans la fibre permet de placer nos cellules dans le spot lumineux à une distance comprise sur l'axe x entre 90 et 120 µm pour chaque mesure (Figure 2).

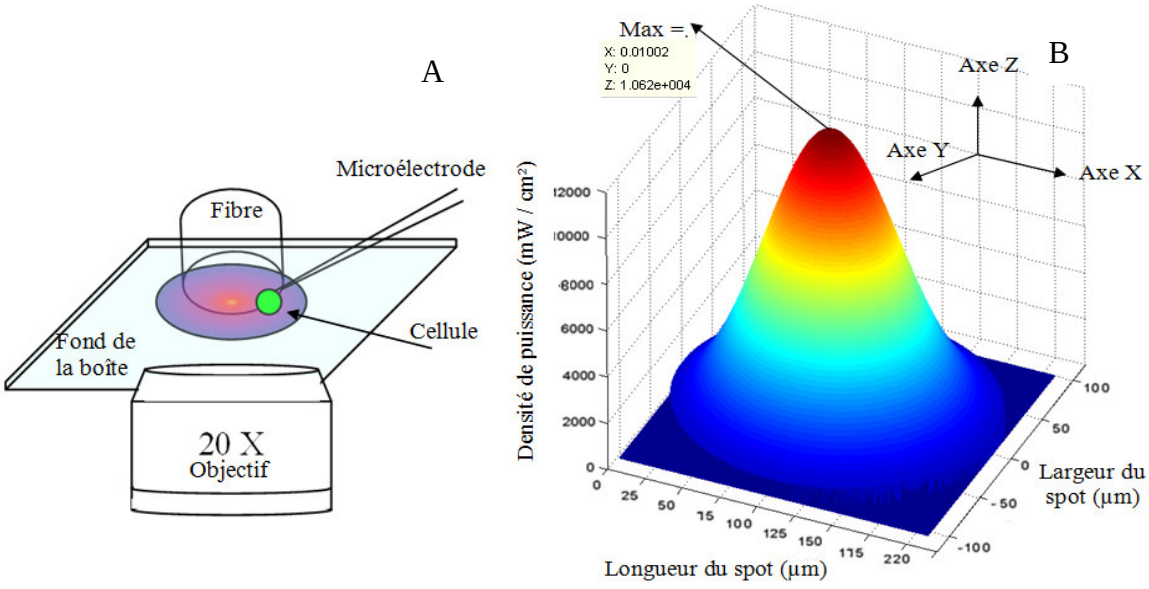


Figure 2 : Forme du spot lumineux sans absorption projeté sur les cellules à une distance de 160 µm suivant un angle de 85° pour les tests électrophysiologiques (pour cet exemple : λ = 1875 nm ; $P_{optique}$ = 230 mW). ***A : vue du dessous du spot laser sur le microscope inversé. B : Résultat de simulation de la répartition de la puissance du faisceau au niveau des cellules.***

Pour les tests d'imagerie calcique, la structure du microscope n'offre qu'un angle α réduit compris entre 18 et 22 ° pour le placement de la fibre. La fibre placée à une distance de 20 ± 10 µm du fond de la boite (axe z) donne un spot de forme ellipsoïdale d'une longueur comprise ente 0,5 et 1,2 mm (axe x).

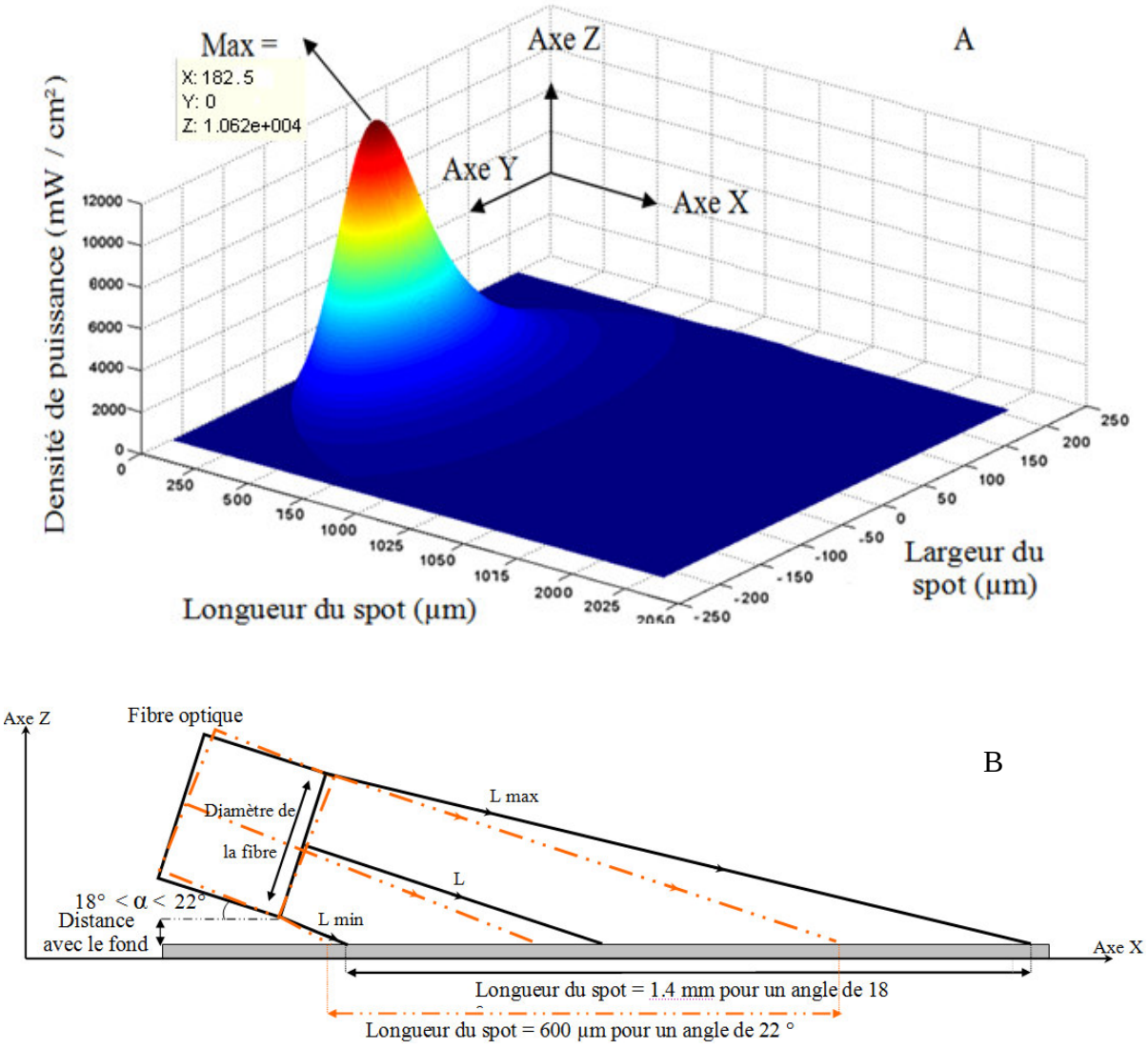


Figure 3 : A : Forme du spot lumineux pour sans absorption projeté sur les cellules suivant un angle de 20 ° pour les tests d'imagerie (pour cet exemple : λ = 1875 nm ; $P_{optique}$ = 230 mW). B : Schéma de la projection du faisceau lumineux suivant l'angle d'inclinaison de la fibre optique pour les tests d'imagerie.

Plus la fibre est inclinée, plus la distribution gaussienne du faisceau est étalée et plus la distance L parcourue par la lumière est grande. La distribution de la puissance optique dépendant directement de la surface totale du spot, celle-ci sera beaucoup plus étalée pour un angle de 20 ° que pour un angle proche de 90 °.

D'autre part, la fibre étant immergée dans le milieu physiologique, il faut prendre également en considération l'absorption du signal aux longueurs d'onde utilisées.

3.1.3. Absorption.

Les mesures ont été réalisées avec trois longueurs d'onde situées dans l'IR. Les longueurs d'onde affichées sont 1470 nm, 1535 nm et 1875 nm.
Cependant, nous avons montré au chapitre 2 que la température a une influence directe sur la longueur d'onde réellement émise. Cela entraîne une variation du coefficient d'absorption. Le tableau 2 résume les résultats pour les trois lasers et pour différentes puissances d'émission.

Laser de 1470 nm			Laser de 1875 nm			Laser de 1535 nm		
Puissance optique (mW)	Longueur d'onde (nm)	Coeff d'absorption (cm^{-1})	Puissance optique (mW)	Longueur d'onde (nm)	Coeff d'absorption (cm^{-1})	Puissance optique (mW)	Longueur d'onde (nm)	Coeff d'absorption (cm^{-1})
450*	1473*	29,85*	*230**	1880*	*33,3**	430*	1541*	13,19*
390	1470	30,6	*190*	1878	*30,3*	370	1537	13,99
310	1468	31,07	150	1877	28,84	300	1535	14,27
230	1464	*31,97*	110	1875	25,92	230	1533	14,59

Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques des lasers de stimulation.
***La déviation thermique n'ayant pas pu être mesurée pour ces puissances, le coefficient d'absorption indiqué a été déduit par extrapolation.**

Dans la suite du chapitre, tous les calculs seront faits avec les coefficients d'absorption corrigés en fonction de la puissance.

Plus la fibre est éloignée des cellules, moins celles-ci reçoivent de puissance. Pour nos tests, la fibre a été placée au plus près des cellules dans une position ne gênant pas les mesures. La fibre est toujours placée en z entre 130 et 200 µm pour les mesures d'électrophysiologie réalisées sur le microscope inversé et à 20 ± 10 µm au cours des tests d'imagerie de fluorescence. En tenant compte de cette distance et de l'angle d'inclinaison de la fibre, la distribution de la puissance optique a été calculée sur la totalité de la surface du spot lumineux projeté (Figure 4).

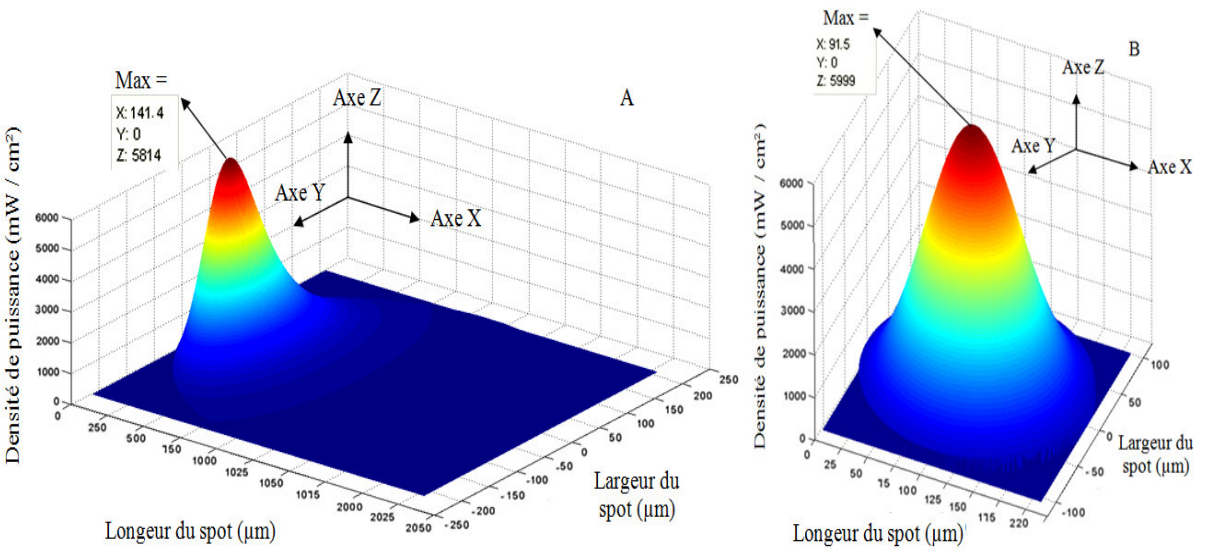


Figure 4 : Distribution de la densité de puissance après absorption suivant le banc de mesure utilisé (pour cet exemple : λ = 1875 nm ; $P_{optique}$ = 230 mW).
A: microscope de fluorescence pour un angle de 20°. B: microscope inversé pour un angle de 85°.

Pour les deux techniques de mesures, l'énergie se répartit sur la surface du spot avec une diminution d'amplitude liée à l'absorption dans le volume traversé par la lumière. Dans le cas du microscope inversé, l'effet de l'absorption se manifeste surtout par une diminution de l'amplitude de la puissance optique sur la totalité du faisceau. Sur le microscope de fluorescence biphotonique, l'absorption joue non seulement sur l'amplitude, mais aussi sur la distribution spatiale de l'énergie dans le spot. Du fait de l'angle d'inclinaison important qui augmente les distances que doit traverser la lumière, le maximum de l'énergie transmis est concentré sur une zone de 300 µm pour une longueur de spot totale de 900 µm (Figure 4.a).

3.1.4. Calcul de la puissance reçue par les cellules.

La puissance reçue par une cellule suivant sa position a été calculée grâce à un programme de simulation écrit avec le logiciel MATLAB. Ces estimations sont réalisées en tenant compte de la taille des cellules de l'ordre de 20 µm pour les CGR et de 40 µm pour les CGV. Les résultats de simulation permettent d'obtenir la gamme de puissance correspondant à la position et à la taille de la cellule dans le spot lumineux (Figure 5). Cette étude permet de localiser la zone où l'énergie reçue par la cellule sera la plus importante. Pour nos tests d'imagerie de fluorescence, la fibre est toujours située sur l'axe X à 160 µm ± 20 µm de la cellule. A cette distance, la cellule reçoit une puissance optique proche du maximum.

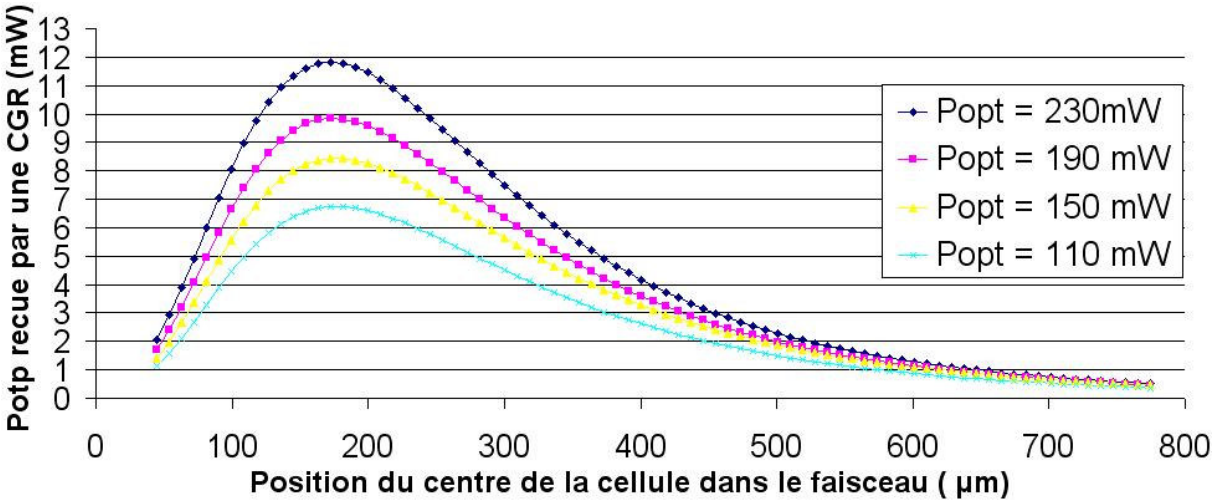


Figure 5 : Variation de la puissance optique reçue par une CGR (diamètre = 20 µm) au cours d'un test d'imagerie en fonction de sa position en X dans le faisceau (λ = 1875 nm).
La fibre est placée à une distance de 20 µm en Z pour un angle d'insertion de 20° et une puissance optique délivrée par le laser en sortie de fibre variable.

De la même manière, la fibre est placée entre 130 et 200 µm de la cellule pour les tests d'électrophysiologie. En isolant la zone du spot correspondant à l'emplacement de la cellule, nous pouvons comparer la puissance reçue par les deux types de cellules (Figure 6).

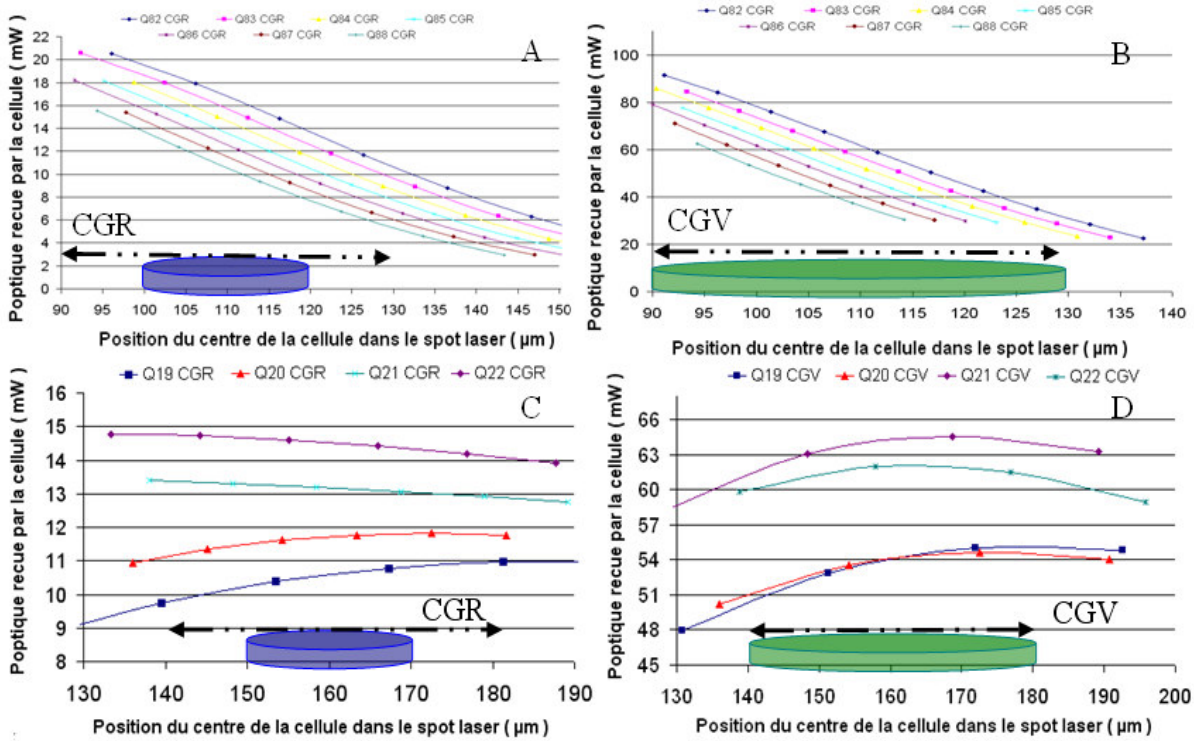


Figure 6 : Gamme de puissance reçue par une cellule suivant sa position dans le spot laser lors des tests avec un laser de 1875 nm délivrant une $P_{optique}$ de 230 mW en fonction de l'angle d'insertion de la fibre.
A : Test électrophysiologique sur une cellule rétinienne. B : Test électrophysiologique sur une cellule vestibulaire. C : Test d'imagerie sur une cellule rétinienne. D : Test d'imagerie sur une cellule vestibulaire (la fibre est située suivant l'axe z, à 160 µm de la cellule en électrophysiologie et à 20 µm en imagerie).

Pour une puissance en sortie de fibre et un placement dans le faisceau identique, une CGV, qui fait approximativement deux fois la taille de la CGR, recevra plus d'énergie que cette dernière. Ces courbes montrent aussi que pour les deux positionnements de la fibre correspondant aux deux types de mesure, une même cellule recevra sensiblement la même gamme de puissance. En comparant les figures 6.A et 6.C ou 6.B et 6.D, on remarque que le placement de la fibre par rapport à la cellule a une influence plus grande en patch clamp qu'en imagerie.

Dans la partie suivante, tous les seuils d'énergies calculés au niveau des cellules seront accompagnés d'une estimation de l'erreur qu'entraîne l'incertitude sur l'angle d'inclinaison de la fibre.

3.2. Paramètre de stimulation.

Cette partie détaille les différentes réponses cellulaires obtenues par stimulation laser sous la forme d'une impulsion unitaire pour différentes configurations d'énergie, de temps, de longueur d'onde et de position. Nous détaillons les résultats obtenus en imagerie de fluorescence pour finir sur ceux obtenus avec la station patch clamp. Les résultats ont été obtenus sur les cultures cellulaires de l'appareil vestibulaire ou de la rétine et sur tranche de rétine de souris.

3.2.1. Imagerie calcique.

Cette partie correspond approximativement à 400 tests ayant permis d'obtenir une centaine de réponses calciques parmi lesquels ne seront présentées que les résultats les plus significatifs.

Nous avons obtenus des résultats avec les trois types de modèles biologiques. Cependant, les points mesurés avec les tranches de rétine sont peu nombreux et correspondent à une prise de mesure unique. En effet, les mesures sur tranche de rétine sont difficilement réalisables car celle-ci est enrobée dans une couche d'agarose qui gêne le positionnement de la fibre et interfère avec la stimulation optique. L'amplitude des réponses est plus faible que celle obtenue sur des cultures de CGR et de CGV (Figure 7). Le marqueur fluorescent utilisé est lui aussi gêné par la structure complexe de la tranche et la couche d'agarose. La concentration de marqueur du calcium est ainsi moins homogène spatialement dans le cas

d’une tranche que pour des cultures. Malgré ces difficultés, ces résultats prouvent qu’une stimulation optique peut induire la réponse de cellules se trouvant dans une tranche de rétine, un milieu se rapprochant des conditions in vivo.

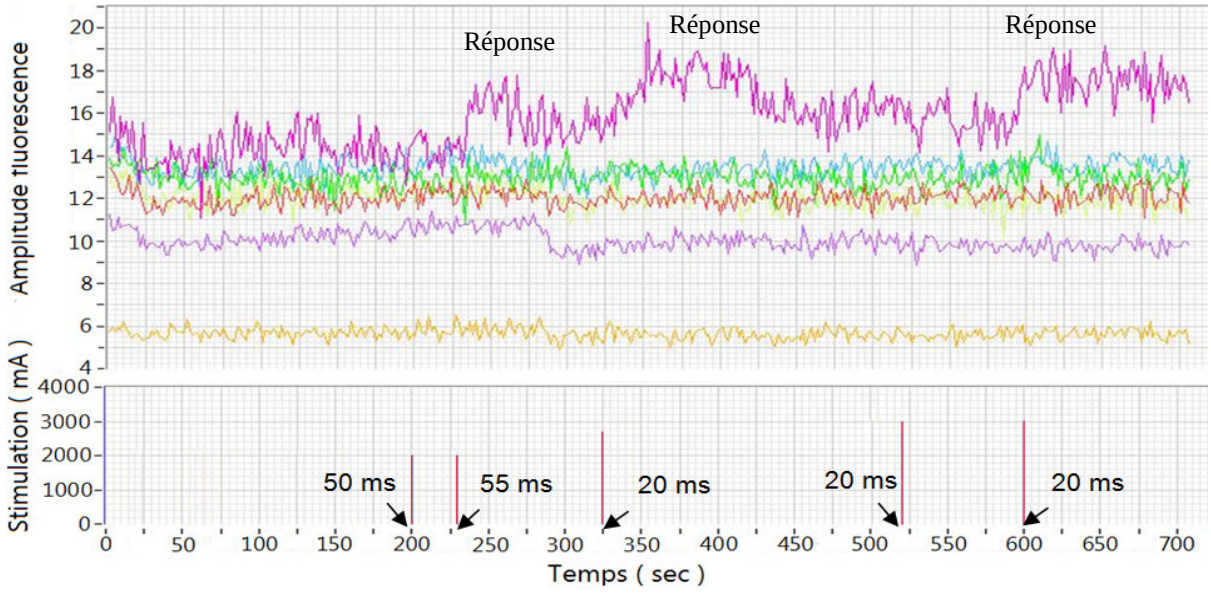


Figure 7 : Réponse calcique de cellules ganglionnaires d’une tranche de rétine induites par un laser (λ = 1875 nm ; $P_{optique}$ = 110 mW ; 150 mW ; 190 mW).
Les réponses sont faibles et bruitées mais clairement identifiables.

3.2.1.1. Notion de seuil de stimulation et de destruction.

La première étape de tests visait à valider notre choix des longueurs d’onde des lasers en identifiant des seuils d’énergie permettant une réponse calcique des cellules sans entraîner un dommage ou une destruction immédiate. La recherche des seuils d’énergie a été effectuée en soumettant les cellules à un protocole de test permettant d’explorer toute la gamme de puissance des lasers. Concrètement, la cellule a été soumise à une série d’impulsions d’amplitude constante et dont la durée ou le nombre ont été progressivement incrémentés (Figure 8).

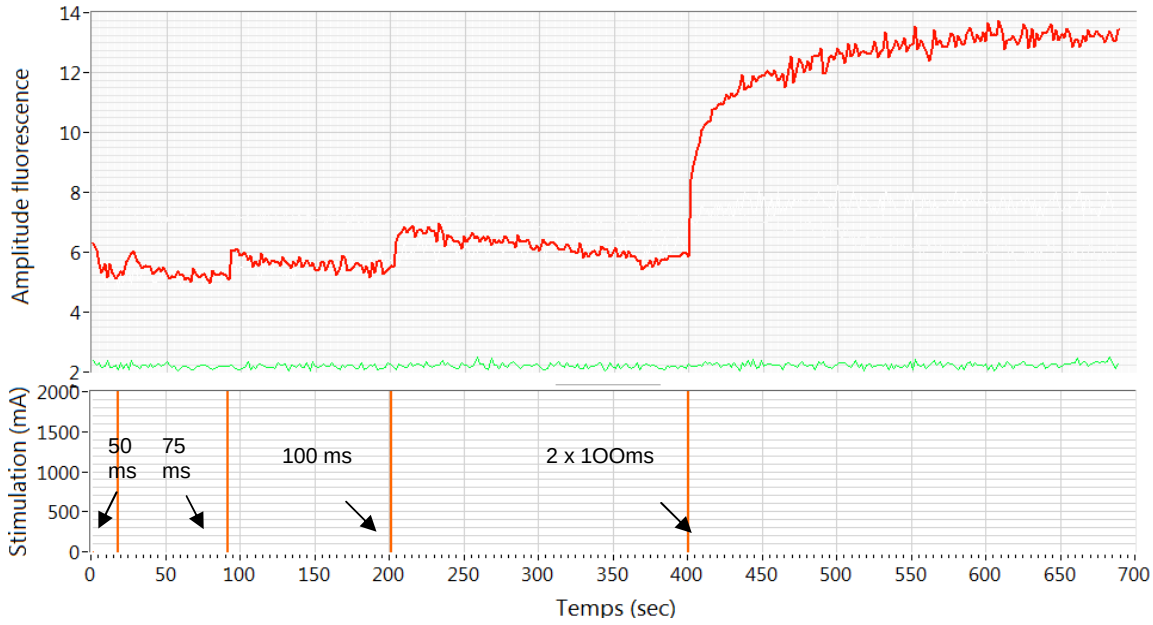


Figure 8 : Notion de seuil de stimulation et d'endommagement de la cellule pour différentes durées de pulses de stimulation. Entrée de calcium dans la cellule vestibulaire lors de stimulations optiques (λ = 1875 nm ; $P_{optique}$ = 110 mW).

Ici, nous observons une réaction faible de la cellule pour une stimulation de 50 ms. Plus la durée des stimulations augmente plus l'amplitude de la fluorescence devient importante. Au cours d'une stimulation, la cellule revient à son équilibre suivant un temps variable. Dans le cas où le calcium n'est pas évacué par la cellule, il devient toxique et entraîne sa mort. Sur cet exemple, nous observons un seuil de stimulation en sortie de fibre de 7,5 mJ (pour t = 50ms) et un seuil d'endommagement de 29 mJ (pour t = 2×100 ms). Entre les deux, l'amplitude des réponses augmente avec les temps de stimulation sans entraîner de dommage cellulaire.

Ces types de résultats ont été observés pour les trois lasers commerciaux ayant des longueurs d'onde différentes. En revanche, nous n'avons pas obtenu de réponses pour le laser à 2200 nm fabriqué par l'IES. Cela s'explique clairement par son manque de puissance (10 fois moins puissant que les lasers commerciaux). Ce laser n'a donc pas été utilisé par la suite et ne sera plus abordé dans ce manuscrit.

La figure 8 montre l'existence d'une plage de stimulation sans endommagement de la cellule. Néanmoins, il reste difficile de donner avec précision une gamme de sécurité propre à chaque modèle biologique et chaque longueur d'onde. En effet, les seuils d'énergie dépendent directement de la viabilité des cellules.

L'importance de la viabilité des cellules est illustrée dans l'exemple suivant qui correspond aux réponses de cellules obtenues à puissance optique constante tout en incrémentant le temps de stimulation (Figure 9).

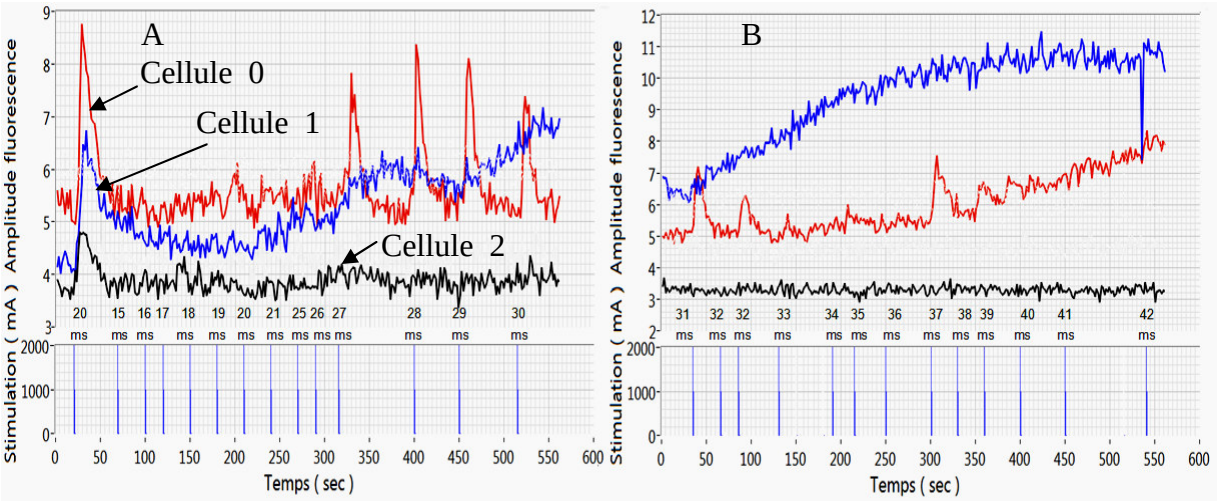


Figure 9 : **Exemple d'une étude sur les réponses d'une cellule vestibulaire soumise à une série de stimulation de durée variable (λ = 1875 nm ; Poptique = 110 mW).**
A : Début du test. B : Fin du test (les temps de stimulation sont inscrits au dessus de chaque pulse).

Dans cet exemple, la première stimulation de 20 ms donne immédiatement une réponse calcique pour une énergie de 2,2 mJ, pour les trois cellules repérées. L'excitation redevient possible pour la cellule 0 pour une énergie de 3 mJ ainsi que pour chaque stimulation de 27 à 37 ms correspondant à une gamme d'énergie en sortie de fibre comprise entre 3 et 4 mJ. Au delà de 37 ms, plus aucune réponse n'est visible. Par contre, les deux autres cellules ne répondent plus après la première impulsion, qui semble les avoir endommagées. Cet exemple montre que si les seuils d'énergie de stimulation dépendent des paramètres définis tels que la longueur d'onde, l'amplitude ou la période du signal de stimulation, ils dépendent aussi de la réactivité des cellules, qui est plus difficilement contrôlable.

Au cours des tests exploratoires ayant permis de définir les seuils de stimulation et d'endommagement, nous avons identifié des seuils d'énergies correspondant à la destruction des cellules. Dans ces tests préliminaires, nous avons soumis une des cellules vestibulaires à dix impulsions de 100 ms espacées de 10 ms toutes les 5 secondes en incrémentant progressivement la puissance délivrée par le laser. Ce protocole nous a permis d'observer deux effets lors de l'enregistrement (Figure 10) : à partir d'un certain seuil de l'ordre de 100 mJ en sortie de fibre, il apparaît des variations rapides du signal lumineux capté par la caméra pendant la durée de chaque stimulation, qui ne sont pas d'origine biologique (voir la flèche 1 sur la figure 10). Cet effet est observable jusqu'à un certain seuil de l'ordre de 200 mJ où la totalité des cellules observées est détruite en causant la perte de tout signal (voir la flèche 2 sur la figure 10).

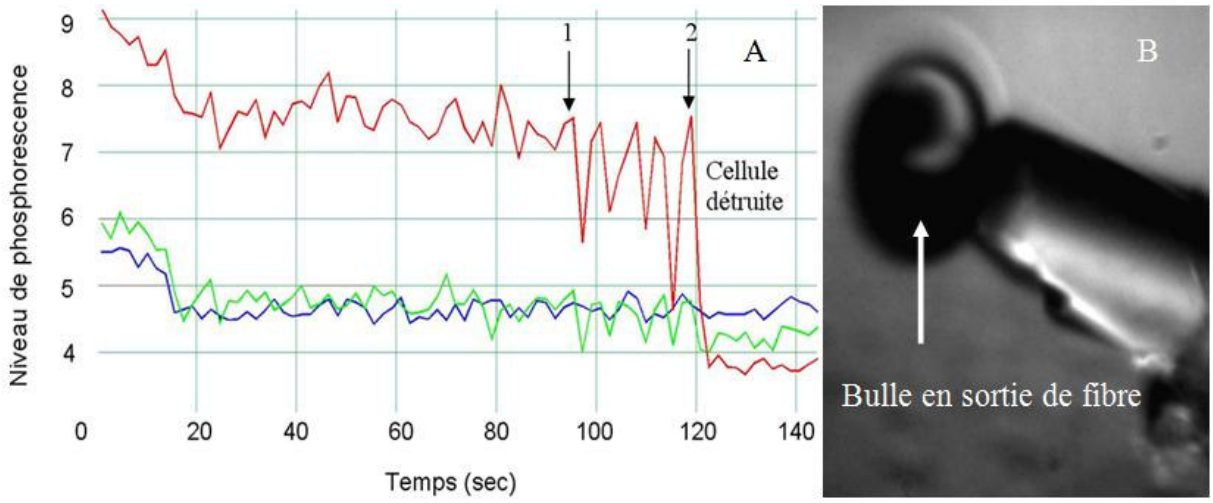


Figure 10 : Seuil d'énergie de destruction des cellules en sortie de fibre (λ = 1875 nm). Protocole utilisé : 16 stimulations espacées de 5 secs. 1 stimulation = 10 impulsions de 100 ms espacées de 10 ms. 50 mW< Poptique < 230 mW.
A : Seuil de parasitage du signal (1) et de vaporisation de l'eau (2). B : Arrêt sur image pendant la création de la bulle en sortie de fibre.

Une étude plus approfondie au moyen d'une caméra nous a permis d'observer l'apparition de bulles signifiant une vaporisation de l'eau en sortie de la fibre optique (Figure 10.B). Ce niveau d'énergie entraîne une destruction des cellules par un effet thermique et/ou mécanique sur toute la zone en face de la fibre. Au cours de ces premiers tests, la fibre était placée à quelques millimètres des cellules. Une fois le placement optimisé, la distance de la fibre se réduit à une centaine de micromètres et ramène le seuil de destruction à une valeur plus faible de l'ordre d'une vingtaine de milli joules.

3.2.1.2. Détermination des seuils d'énergie de stimulation.

Cette partie est la synthèse des résultats obtenus en imagerie de fluorescence des ions calciums. Elle décrit les seuils de stimulation en fonction des différents modèles biologiques et de la longueur d'onde utilisée.

a. Description de la mise en forme des résultats.

Les résultats sont présentés sous forme de figure exprimant les seuils d'énergie de stimulation en fonction du temps de stimulation. Les valeurs seuils sont calculées par le produit de la puissance optique en sortie du laser et du temps de stimulation :

$$E = P_{optique} \times T_{stimulation}$$

Par exemple, pour le laser de 1475 nm, les valeurs de seuils de puissance ou d'énergie obtenus en sortie de la fibre placée à 20 µm selon z sur des cellules vestibulaires peuvent être représentées en fonction du temps (Figure 11).

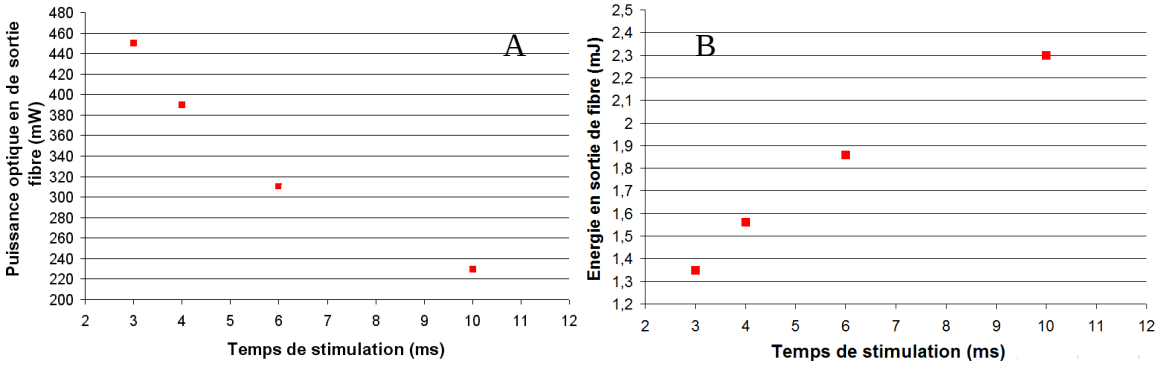


Figure 11 : Seuils de puissance (A) et d'énergies (B) en fonction du temps de stimulation d'une impulsion obtenus sur des CGV (λ = 1470 nm).

Chaque point de mesure correspond à une valeur de temps de stimulation pour laquelle une réponse cellulaire a été enregistrée. Afin de prendre en compte l'incertitude de la mesure, un calcul d'erreur a été opéré sur chaque point (Figure 12). Ce calcul prend en considération la valeur du temps de stimulation précédant celui qui a permis d'obtenir une réponse cellulaire :

$$\Delta E = P \times \Delta T_{stimulation}$$

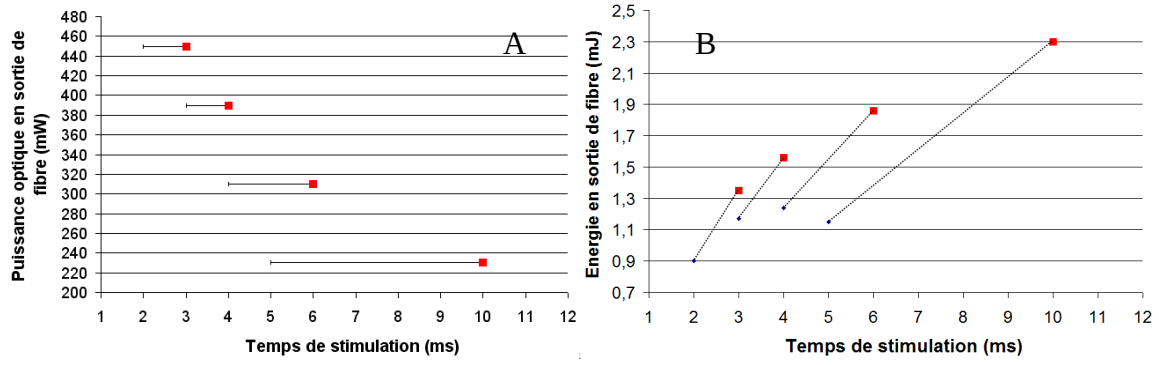


Figure 12 : Représentation de l'incertitude des seuils d'énergie de stimulation décomposé sous la forme des seuils de puissance (A) et d'énergie (B) en fonction des temps de stimulations obtenus sur des CGV (λ = 1470 nm).

Dans le cas où des points ne possèdent pas de barre d'incertitude, il s'agit d'essais où les cellules ont répondu à la première stimulation employée.

Il faut ensuite calculer la quantité d'énergie reçue par la cellule qui conduira à son excitation, en se basant sur les précédents résultats de simulation, qui tiennent compte de l'angle d'inclinaison et de la distance de la fibre avec les corps cellulaires.
Pour prendre en compte cette incertitude sur la mesure, nous afficherons sur les figures les barres d'incertitude :

$$P_{cellule} = P_{20°} \pm \Delta P$$

Sachant que :

$$E = P \times T_{stimulation}$$

Nous obtenons une incertitude sur E :

$$\Delta E = \frac{\Delta P}{P} \times E \quad \text{avec } \Delta T = 0$$

Concernant la tranche de rétine, l'incertitude du placement de la fibre par rapport aux cellules n'étant pas connue, le programme de simulation n'a pas pu être utilisé.

b. Effets de la durée de stimulation.

Différents tests ont été réalisés sur les trois types de modèles biologiques disponibles avec la longueur d'onde de 1870 nm en faisant varier la durée de la stimulation de 15 ms à plus de 100 ms (Figure 13). Les résultats sont présentés sous deux représentations de seuils d'énergie. L'un exprime l'énergie envoyée en sortie de fibre et l'autre l'énergie reçue au niveau des cellules, en fonction des temps de stimulation utilisés.

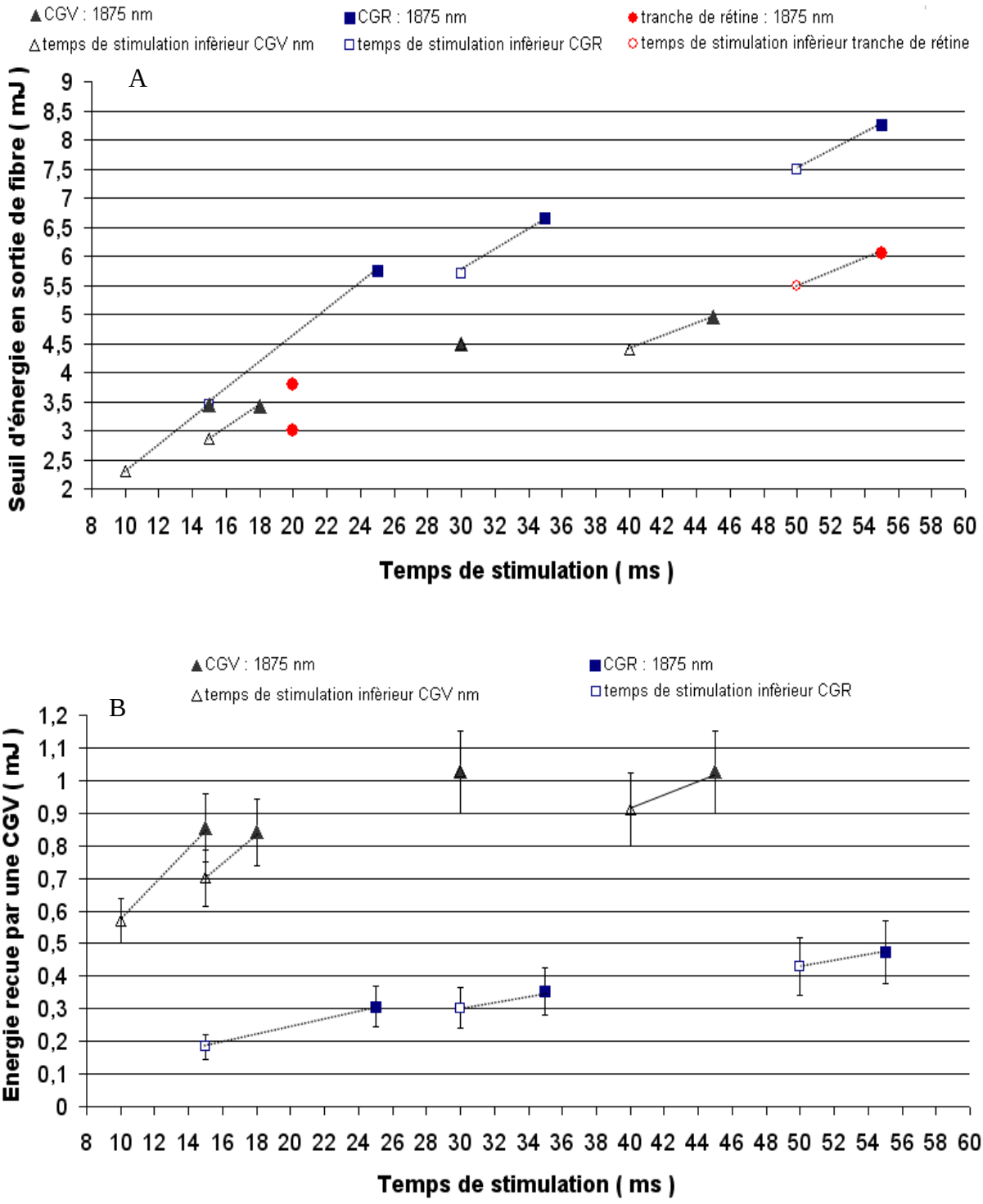


Figure 13 : Seuils d'énergie d'excitation obtenue pour les trois modèles biologiques à 1870 nm.
A : Seuil d'énergie en sortie de la fibre optique. L'erreur correspond au temps de stimulation inférieur testé avant d'obtenir une réponse. B : Seuils d'énergies calculés au niveau de la cellule. L'erreur cumule la gamme d'énergie reçue par la cellule suivant sont placement dans le faisceau et de l'angle d'inclinaison de la fibre et du temps de stimulation inférieur testé avant d'obtenir une réponse

La tendance générale pour les trois types de cellules montre que le seuil d'énergie de stimulation diminue de façon linéaire en réduisant le temps d'excitation.

La figure 13.A donne les seuils d'énergies obtenues en sortie de fibre. Compte tenu de l'incertitude sur la valeur des temps de stimulation, les valeurs seuils des trois types de cellule semblent évoluer dans la même gamme.

La figure 13.B reprend les résultats de la figure 13.A en représentant les seuils d'énergie calculés au niveau des cellules vestibulaires et rétiniennes. Les barres d'incertitude utilisées prennent en compte, comme précédemment, la valeur du pas d'incrémentation du temps de stimulation, mais aussi la différence de puissance reçue par la cellule suivant l'angle d'inclinaison de la fibre entre 18 et 22°. Comme pour le graphique 13.A, la tendance générale montre des seuils d'énergie de stimulation qui diminuent linéairement suivant la diminution du temps d'excitation pour les deux types de cultures.

Les autres tests réalisés à 1470 nm et 1535 nm ont été réalisés uniquement sur des CGV et ne permettent pas une comparaison avec les deux autres types de cellules.

c. Effets de la longueur d'onde.

Les trois lasers commerciaux à trois longueurs d'onde différentes ont pu être testés sur des CGV et tous les trois ont permis d'obtenir des réponses calciques (Figure 14).

Les figures 14.A et 14.B indiquent les seuils d'énergie en fonction des temps de stimulation, en sortie de fibre pour l'une et au niveau cellulaire pour l'autre. Ce double affichage est donné à titre informatif pour indiquer la différence d'énergie. Pour plus de clarté, nous situerons uniquement les valeurs seuils figurant sur la figure 14.B où est indiquée l'incertitude relative au temps de stimulation et à l'angle d'insertion de la fibre optique. Pour les trois longueurs d'onde, l'effet de la durée d'excitation sur les seuils d'énergie est analogue : les seuils se réduisent quand le temps de stimulation diminue.

Les résultats montrent que la longueur d'onde a une incidence directe sur la valeur des seuils d'énergie de stimulation. Ce phénomène se vérifie d'autant plus pour des lasers possédant des puissances optiques équivalentes comme dans le cas des lasers de 1535 nm et 1470 nm. Le laser de 1470 nm donne un seuil de stimulation situé entre 0,45 J et 0,70 J. Celui obtenu avec le laser de 1541 nm est compris entre 3,76 J et 5,95 J, les temps de stimulation étant plus importants dans ce dernier cas. Cela peut s'expliquer par la différence des coefficients d'absorption : l'énergie étant moins absorbée, il faut en fournir davantage pour obtenir le même effet.

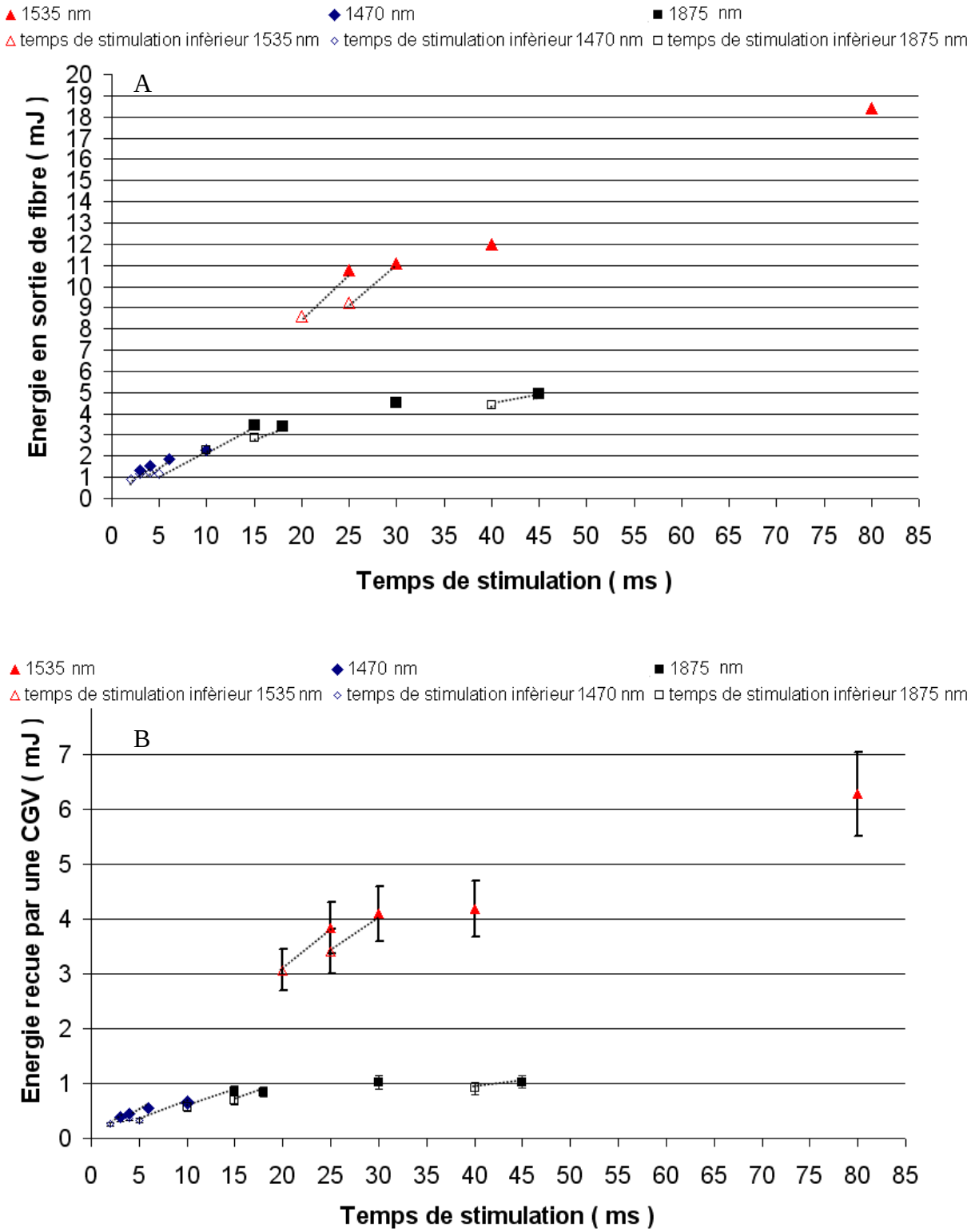


Figure 14 : Seuils d'énergie d'excitation de CGV obtenues pour les trois longueurs d'onde.
A : Seuils d'énergies calculés en sortie de fibre. L'erreur correspond au temps de stimulation inférieur testée avant d'obtenir une réponse. B : Seuils d'énergies calculés au niveau de la cellule. L'erreur cumule la gamme d'énergie reçue par la cellule suivant son placement dans le faisceau et de l'angle d'inclinaison de la fibre et du temps de stimulation inférieur testé avant d'obtenir une réponse.

Le laser à 1875 nm permet d'obtenir des réponses cellulaires dans la même gamme de temps de stimulation que le laser de 1535 nm : un temps de stimulation de 30 ms permet d'atteindre un seuil d'énergie de 1 mJ pour le laser de 1875 nm et de 4 mJ pour le laser de 1535 nm. Là encore, cette différence dans les valeurs de seuil d'énergie de stimulation peut s'expliquer par la différence d'absorption de l'eau à ces longueurs d'onde (Figure 15).

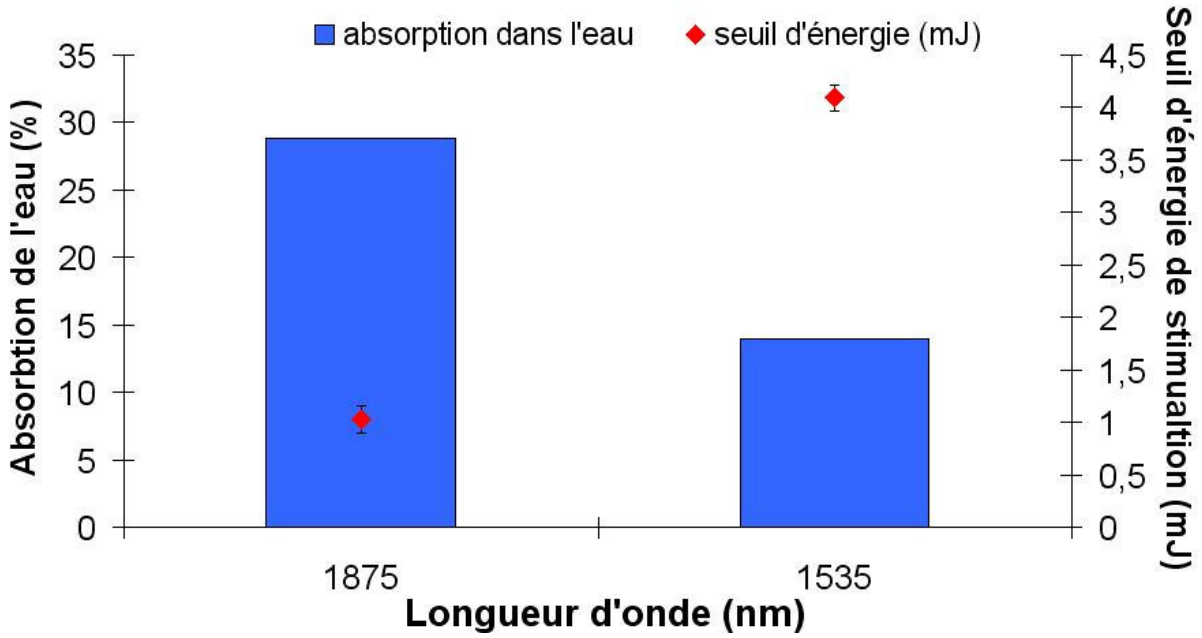


Figure 15 : Superposition des seuils d'énergie de stimulation et de l'absorption dans l'eau calculée sur une distance de 160 µm pour deux valeurs de longueurs d'onde et une stimulation de 30 ms.

Le calcul du pourcentage d'énergie absorbée dans 160 µm d'eau permet de retrouver un rapport identique entre la différence d'absorption de l'eau et les valeurs seuils pour ces deux longueurs d'onde. Il apparaît clairement qu'un coefficient d'absorption important permet d'obtenir des seuils d'énergie de stimulation plus faible.

En ce qui concerne les lasers de 1875 nm et 1470 nm, leurs coefficients d'absorption sont de valeurs voisines et peuvent devenir identiques en tenant compte de la dérive de la longueur d'onde due à l'échauffement du laser (Tableau 2). La différence entre ces deux lasers, outre leur longueur d'onde, est leur puissance optique de sortie. En effet, la puissance maximum atteinte avec le laser de 1875 nm correspond à la puissance minimum du laser de 1470 nm. On observe ainsi que les seuils de stimulation mesurés à 1470 nm sont dans la continuité des points obtenus à 1875 nm et ont lieux pour des temps de stimulation plus courts (Figure 16).

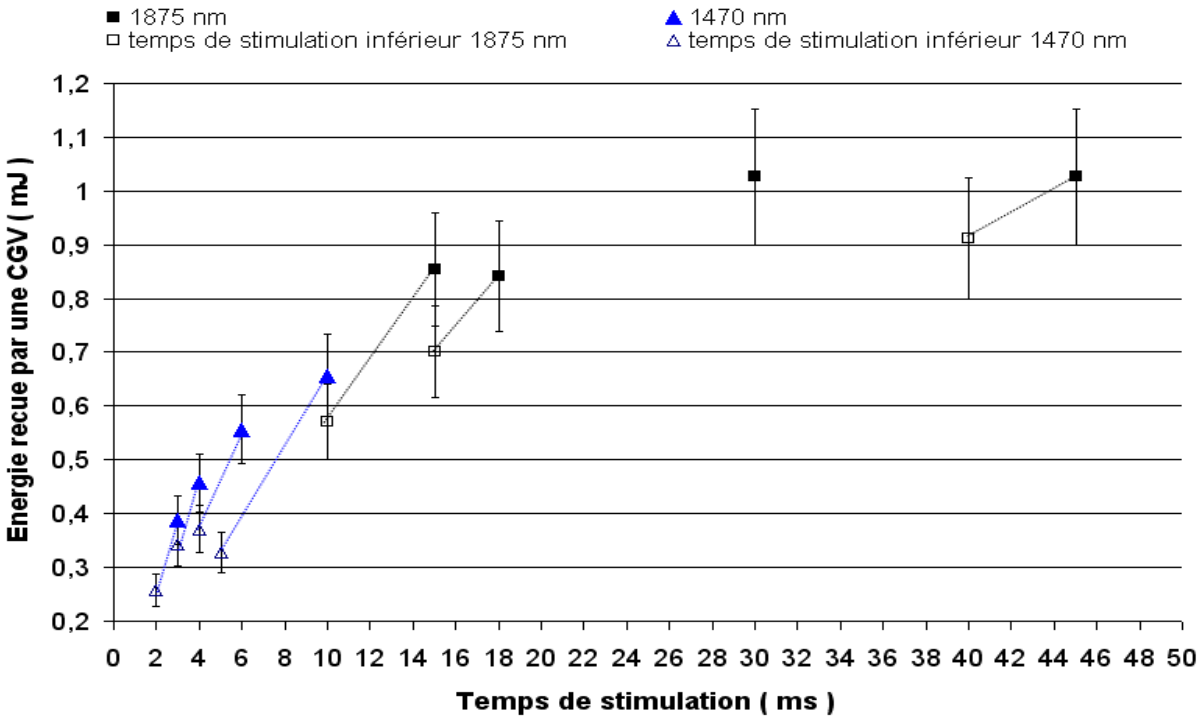


Figure 16 : Mise en évidence de la continuité des seuils d'énergie d'excitation de CGV obtenues à 1470 nm et 1875 nm.

La zone qui nous intéresse se situe à des temps de stimulation compris entre 10 ms et 15 ms qui correspondent au premier point de mesure à 1470 nm (P_{opt} = 230 mW) et au dernier point de mesure à 1875 nm (P_{opt} = 230 mW). Pour ces points là, la puissance optique et le coefficient d'absorption autour de 31 cm^{-1} sont similaires. L'incertitude indiquée sur la figure 16 montre que l'énergie mesurée à 10 ms avec le laser de 1470 nm correspond avec la gamme d'énergie pouvant être obtenue avec le laser de 1875 nm.

Il est possible de conclure que deux longueurs d'onde ayant un coefficient d'absorption identique correspondent à des seuils d'énergie de stimulation similaire. Cela tend donc à valider l'hypothèse selon laquelle l'absorption de l'eau reste le paramètre important à prendre en considération pour une stimulation laser de neurones.

d. Comparaison avec les résultats des autres équipes.

Il est bien sûr tentant de faire une comparaison entre nos valeurs de seuils d'énergie et ceux obtenu par les autres équipes. Cependant, cela s'avère très difficile. Tout d'abord, les conditions expérimentales employées lors de ces tests ne sont pas toujours indiquées clairement. La forme exacte du faisceau en sortie de fibre ne semble pas prise en compte, de

même que l'angle d'inclinaison de la fibre. Afin de pouvoir se rapprocher de leur mode opératoire, nous avons recalculé les seuils d'énergie de stimulation en considérant la totalité de la surface du faisceau projeté avec une distribution de l'énergie uniforme (Figure 17). Les seuils d'énergies calculés correspondent aux mesures effectuées sur des cellules vestibulaires à 1875 nm pour un angle d'inclinaison de la fibre de 20°, la barre d'erreur indique la variation de l'énergie entre 22° et 18°.

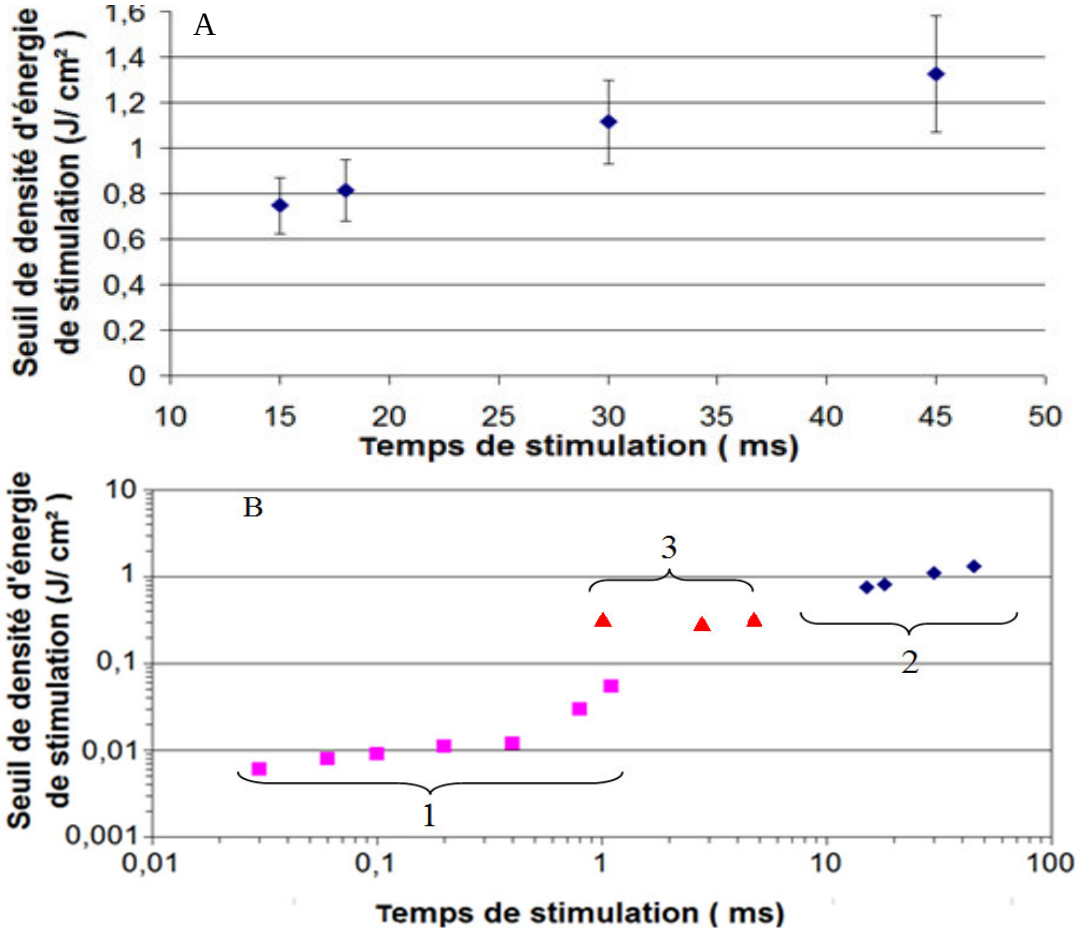


Figure 17 : Seuils de densité d'énergie de stimulation suivant le temps de stimulation calculé sur la totalité du spot projeté.
A : Résultat en imagerie pour un laser de 1875 nm avec une fibre placée à 200 µm des cellules vestibulaires. B : Comparaison entre nos résultats d'imagerie à 1875 nm (2) et les résultats obtenus sur l'appareil auditif d'une gerbille (d'après : Richter [61]) à une longueur d'onde non précisée mais comprise entre 1,844 et 1,873µm (1) et les résultats obtenus sur le nerf sciatique (d'après : Wells [57]) pour un laser de 1870 nm (3).

Les valeurs obtenues sont supérieures à celles indiquées par les équipes de recherche de J. Wells ou de C.-P. Richter pour un laser de longueur d'onde voisine, comprise entre 1844 et 1940 nm. Mais il existe des différences très importantes entre les paramètres des expériences faites par les différentes équipes :

Tout d'abord, les temps de stimulation ne sont pas du même ordre de grandeur, et on sait que les phénomènes thermiques sont dépendants du temps, comme cela sera montré au chapitre suivant. Ensuite, les résultats des autres équipes ont tous été obtenus pour des travaux in vivo. Par exemple, l'équipe de J. Wells stimule la surface entière du nerf sciatique alors que nous stimulons une cellule isolée. On doit donc s'attendre à des valeurs de seuils d'énergie différentes.

3.2.1.3. Impact du positionnement de la fibre.

Un des objectifs dans notre étude d'une nouvelle méthode de stimulation est d'obtenir une résolution spatiale meilleure que la stimulation électrique. Nos premiers résultats vont dans ce sens, car ils prouvent que le placement de la fibre vis-à-vis de la cellule visée est primordial. Il a ainsi été constaté qu'au cours d'une stimulation laser, les réponses enregistrées correspondent à une zone réduite correspondant à celle observée à l'aide de la lumière visible de guidage. Les cellules visibles dans le champ optique du microscope et placées à proximité de la zone ciblée ne réagissent pas à la stimulation (Figure 18).

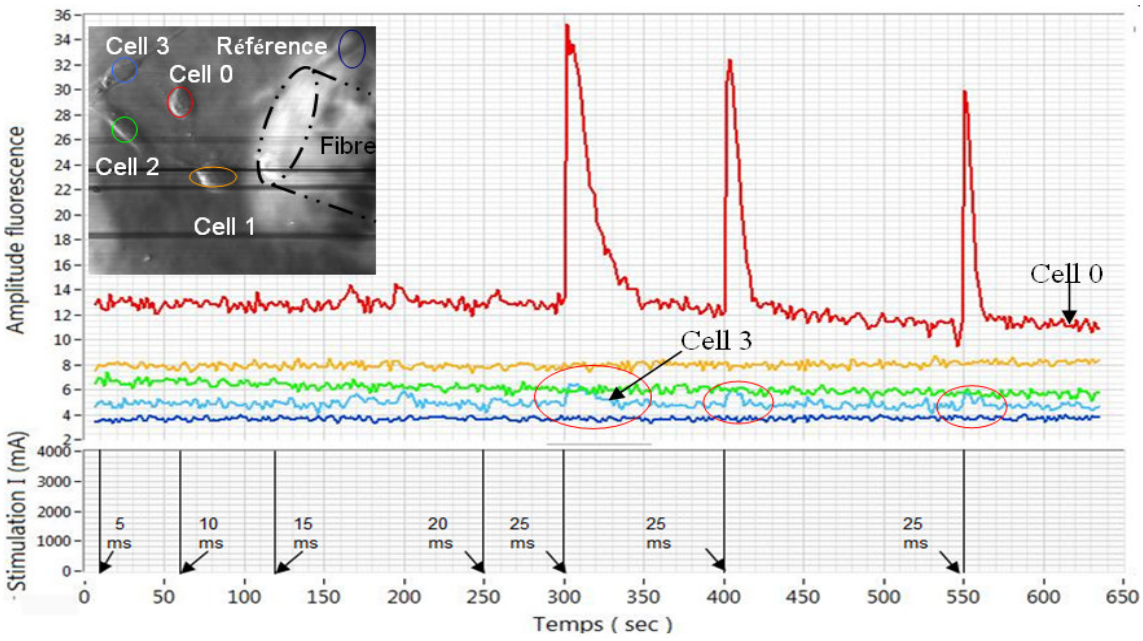


Figure 18 : Exemple de réponses calciques de cellules vestibulaires en fonction de la position de la fibre (λ = 1875 nm).

Dans la figure ci dessus, les deux cellules qui répondent à la stimulation sont toutes les deux en face et centrées par rapport à la fibre optique. Les résultats de simulation concordent avec

les distances obtenues expérimentalement, car ils montrent qu'à cette distance, la cellule 0 (rouge) est placée dans la zone la plus énergétique du faisceau et les cellules 1, 2 et 3 dans une zone de plus faible énergie (Figure 19).

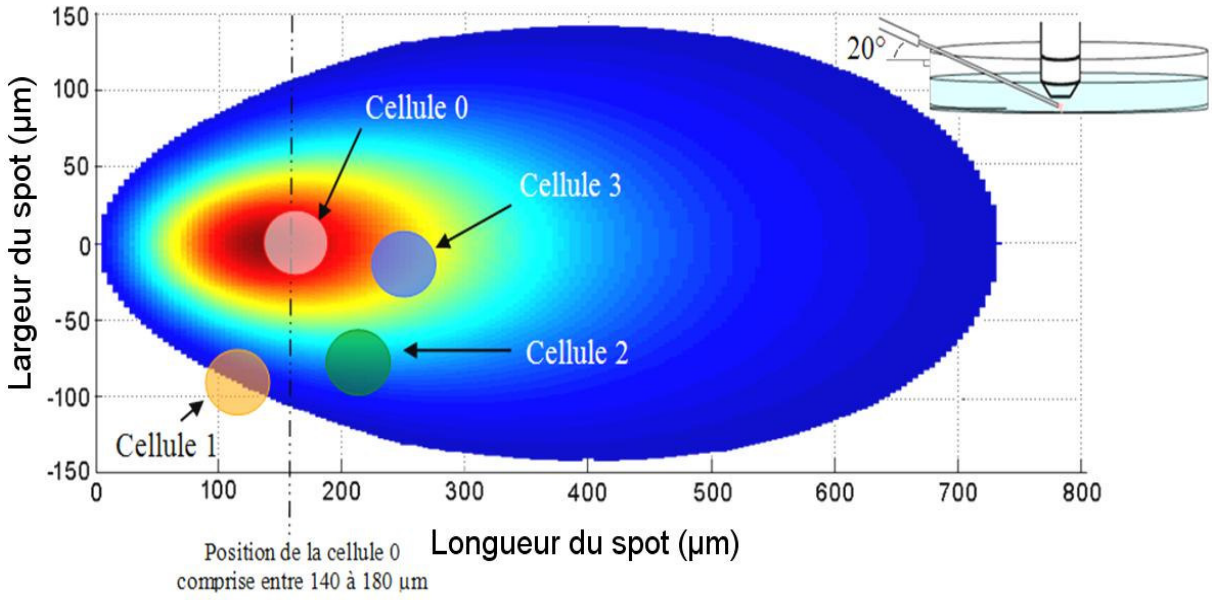


Figure 19 : Représentation de la puissance reçue par des cellules vestibulaires suivant leurs placements dans le faisceau lumineux pour un laser de 1875 nm de $P_{opttique}$ = 230 mW et un angle d'inclinaison de la fibre de 20°.

Les cellules ont été soumises à une énergie de 5,75 mJ en sortie de fibre. La différence d'amplitude des réponses observées s'explique par le positionnement des cellules dans le faisceau lumineux projeté. La cellule 0 est placée au point le plus énergétique et reçoit environ 1,4 mJ alors que la cellule 3, placée plus loin, ne reçoit qu'environ 0,7 mJ. Le seuil de stimulation a été atteint pour les deux cellules et la différence d'amplitude des réponses s'explique par la disparité de la quantité d'énergie reçue par chaque cellule.

Cette résolution spatiale de la stimulation laser avait déjà été mentionnée dans l'étude de J. Wells [63]. Dans celle-ci, il constatait que l'utilisation du laser permet une sélectivité dans le choix du muscle à commander. Là où une stimulation électrique fait réagir un grand nombre de fibres musculaires (mouvement de la partie postérieure de l'animal), la stimulation optique permet une sélection plus réduite (patte uniquement).

3.2.1.4. Autres caractéristiques des réponses.

Les tests réalisés sur des CGR et des CGV ou des tranches de rétines nous ont permis d'enregistrer différentes sortes de réponses calciques. Cette partie donne un aperçu des différences d'allures observées sur les réponses enregistrées et des effets induits par une stimulation laser.

a. Durée des réponses.

Rappelons que l'imagerie de fluorescence calcique permet d'observer les déplacements des ions calciums entre le milieu intra et extracellulaire. Les tests d'imagerie réalisés ont permis d'observer des réponses pour ces trois types de modèles.

Ainsi, pour des cellules rétiniennes ou vestibulaires, le temps d'entrée du calcium reste constant et ne dépasse pas les dix secondes. En revanche, le temps de rétablissement de la cellule peut varier de façon importante d'une cellule à l'autre au sein d'un même milieu de culture, et ce, quel que soit le type de cellule utilisée (Figure 20).

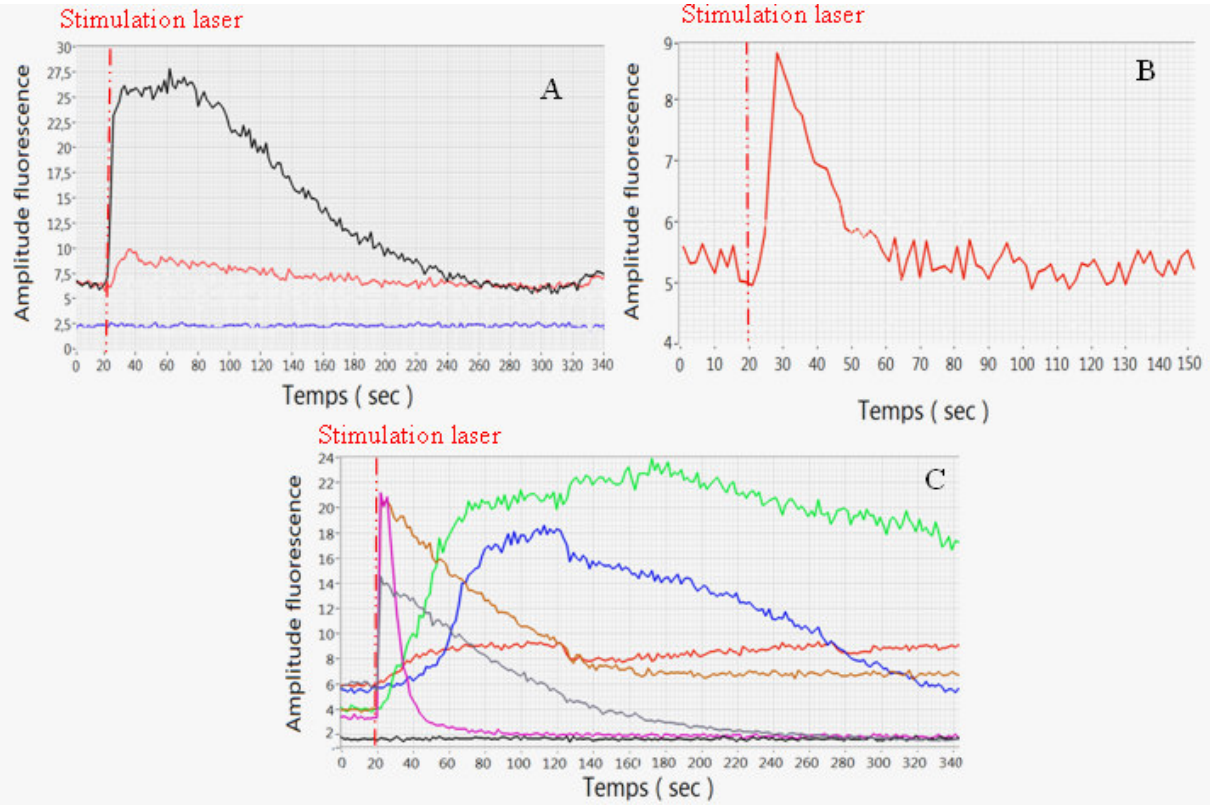


Figure 20 : Exemples d'allures de réponses calciques observés au cours d'une stimulation laser.
A : Réponse lente observée sur une CGV. B : Réponse rapide observée sur une CGV. C : Réponses multiples observées sur une culture de cellule rétinienne.

Le temps de réaction d'une cellule semble être un bon indicateur de son état physiologique. Une cellule qui réagit et revient au repos rapidement montre une bonne tolérance à la stimulation optique et permet des périodes de test plus importantes qu'une cellule au retour plus lent.

Pour les tests d'imagerie réalisés sur les cellules vestibulaires, des réponses de cellules gliales ont été également observées. En effet, une culture de cellules vestibulaires comprend un nombre important de cellules gliales possédant également des canaux calciques potentiellement stimulables. Les différentes allures des réponses observées peuvent venir du fait que ces cellules ne régissent pas de la même manière que les cellules vestibulaires.

b. Temps d'attente entre les réponses.

Quel que soit le temps que met la cellule à revenir à son état d'équilibre au cours des tests, il est important de ne pas la soumettre à une nouvelle excitation optique pendant cette durée. Dans le cas contraire, la cellule semble ne pas pouvoir réagir pleinement à cette nouvelle stimulation (Figure 21).

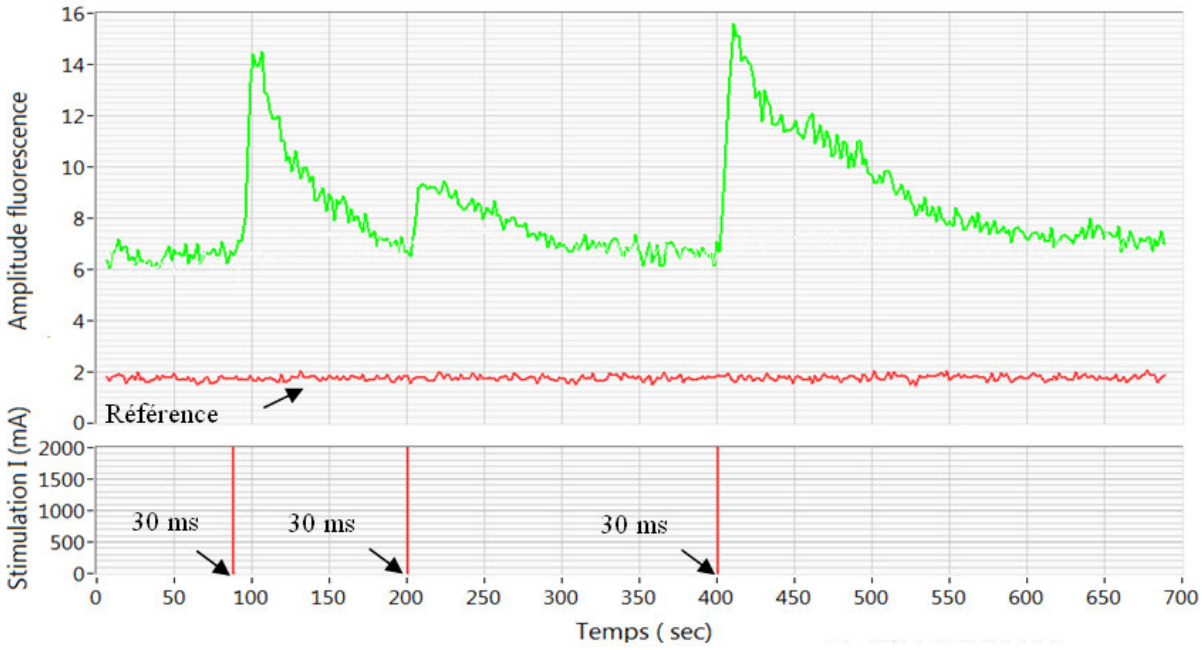


Figure 21 : Exemple de l'importance du temps de récupération d'une cellule vestibulaire après et avant une stimulation optique de 30 ms.

Sur l'exemple ci-dessus, il apparaît clairement que la deuxième stimulation de 30 ms est trop anticipée et entraîne une réponse de la cellule beaucoup plus faible que la précédente. Au contraire, si le temps d'attente après une réponse est suffisant (comme ici avec une stimulation à 400 secondes), l'amplitude retrouve le même niveau que la première. A la vue des différents résultats obtenus, il semble que le temps de récupération soit moins important chez les CGR que chez les CGV. Néanmoins, des tests supplémentaires devront être effectués pour apporter une confirmation à ces observations.

c. Apparition d'un effet réseau.

Au cours de tests, il n'est pas rare d'observer des réponses multiples de cellules qui pour certaines, apparaissent bien après la stimulation laser. Ce phénomène s'observe principalement sur des cultures cellulaires où les corps cellulaires ont établi des connexions dendritiques avec leurs cellules voisines. Ainsi, au cours d'une stimulation laser qui n'entraîne la réponse que d'une seule cellule, il est possible d'observer des réponses décalées dans le temps d'une ou plusieurs cellules placées à proximité mais hors de la zone stimulée par le laser (Figure 22).

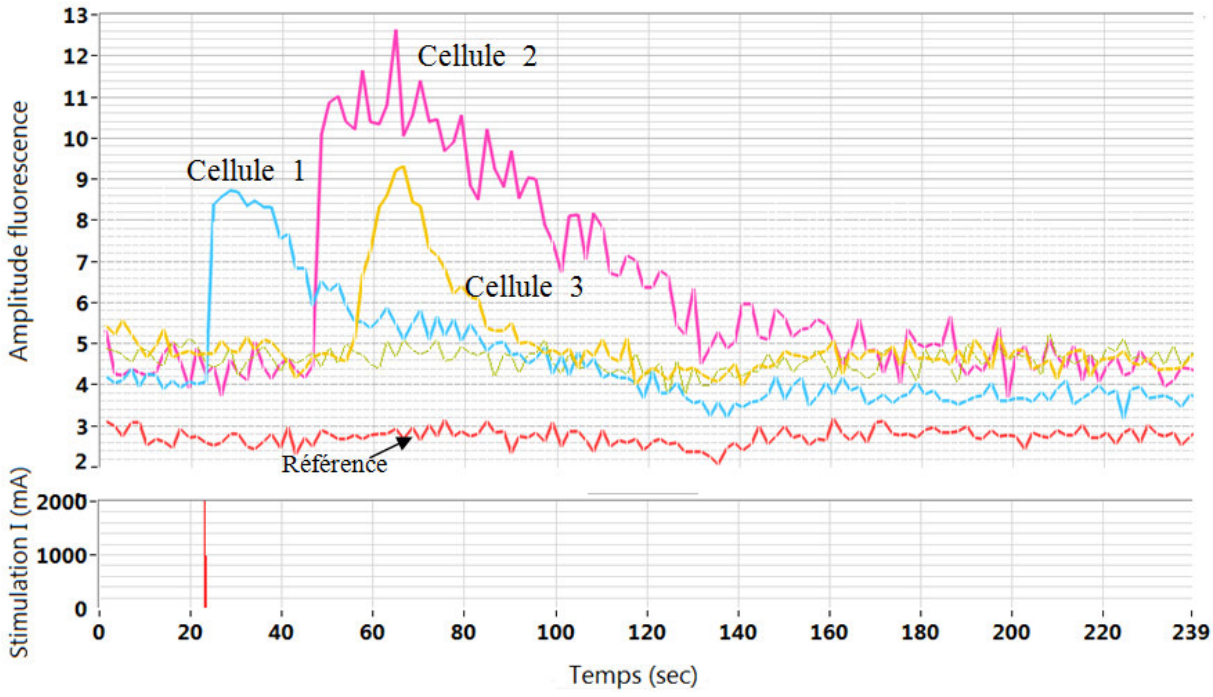


Figure 22 : Exemple d'un phénomène de réseau induisant des réponses multiples. La cellule 1 réagit à la stimulation alors que les cellules 1 et 2 réagissent à la réponse de la cellul1e 1.

Dans cet exemple, la cellule 1 répond à une stimulation optique à 20 secondes. Alors que celle-ci est en train de revenir à son état d'équilibre, nous observons une réponse de la cellule 2 à 48 secondes et de la cellule 3 à 55 secondes. Ce décalage temporel des réponses par rapport à la stimulation optique montre que ces cellules réagissent non plus à notre stimulation, mais bien en réponse à l'excitation de la cellule 1. Cet exemple montre que la stimulation laser engendre des interactions d'ordre biologique entre des cellules voisines et reliées.

3.2.2. Tests d'électrophysiologie par la technique du patch clamp.

Les mesures électrophysiologiques par la technique du patch clamp ont été réalisées sur un microscope inversé qui permet un placement plus aisé de la fibre. Pour ces tests, la fibre optique est insérée avec un angle d'inclinaison de 85° ± 3° dans le bain. Cette mise en place reste identique pour tous les résultats réalisés et détaillés ci-dessous.

3.2.2.1. Protocole de mesure

Les tests de patch clamp ont été réalisés sur des cultures cellulaires du vestibule et de la rétine. Si initialement, il était prévu de réaliser les tests en plaçant l'électrode de mesure en configuration « cellule attachée », c'est la solution du mode « cellule entière» qui a été utilisée pour les tests. Ce mode permet en effet un contrôle total de la cellule et l'obtention de signaux de plus grande amplitude.

Une fois le placement de la fibre et de l'électrode de mesure effectué, chaque cellule est soumise à une stimulation électrique via l'électrode de patch afin de vérifier sa viabilité. Toute cellule ne répondant pas à cette stimulation préliminaire est écartée. Classiquement cette excitation correspond à une impulsion de tension au cours de laquelle la cellule répond par un ou plusieurs potentiels d'action (PA) suivant sa réactivité (Figure 23).

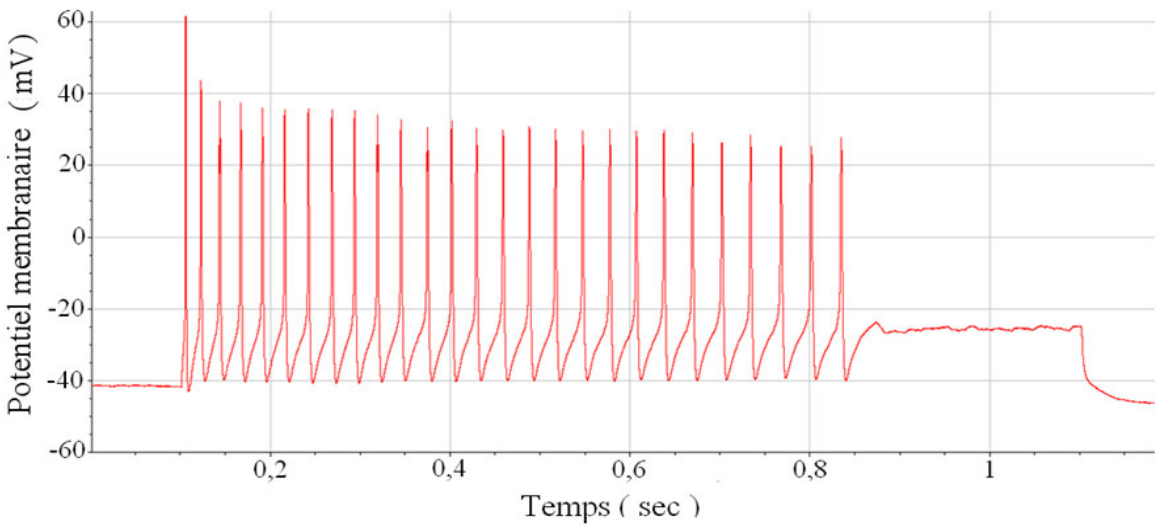


Figure 23 : Potentiel d'action obtenu par stimulation électrique permettant de vérifier la viabilité de la cellule sélectionnée avant de la stimuler optiquement.

L'usage de l'excitation électrique est un outil permettant de surveiller périodiquement l'état de la cellule en cours et en fin de test laser.

3.2.2.2. Description des réponses.

De nombreuses réponses obtenues au cours des tests correspondent à une variation du potentiel membranaire de la cellule sans génération de potentiel d'action. Ces dépolarisations se présentent sous différentes formes mais laissent apparaître des points communs pendant la stimulation laser. Cette partie donne un descriptif des différentes variations de potentiel enregistrées et des comportements induits lors d'une stimulation laser sans aborder les critères biologiques qui feront l'objet d'une partie du chapitre 4 et de la thèse de Mlle Emmanuelle Albert.

a. Présentation des différentes formes de variation du potentiel membranaire.

La grande majorité des réponses obtenues sur des cellules vestibulaires et rétiniennes sont de types dépolarisation sans apparition de PA (Figure 24).

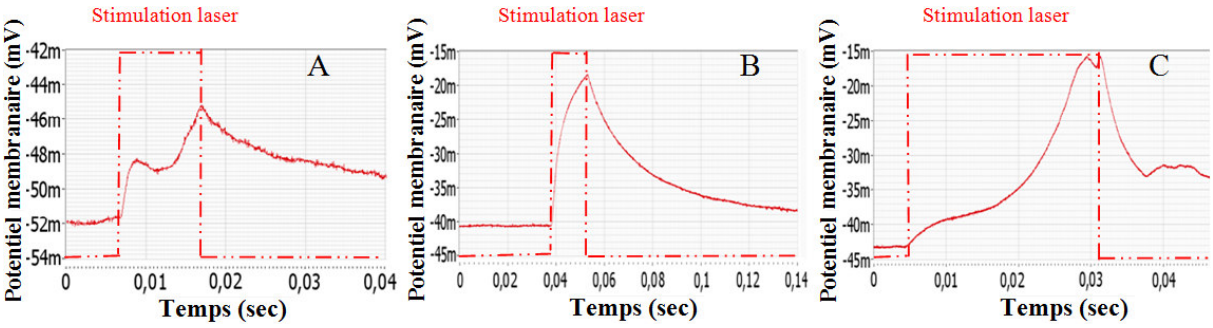


Figure 24 : Exemples de différentes allures de dépolarisation obtenue durant les mesures.
A : réponse d'une CGR (λ = 1875 nm ; T =10 ms). B : réponse d'une CGV (λ = 1875 nm ; T = 15 ms). C : réponse d'une CGV (λ = 1470 nm ; T = 25 ms).

La figure 24 présente différentes formes de dépolarisation ayant toutes été observées au moins une fois avec les deux types de cellules en utilisant les trois longueurs d'ondes. La différence entre ces réponses se situe dans l'évolution du potentiel au cours de la dépolarisation. Les figures 24.A et 24.C montrent une dépolarisation qui passe par une phase prenant temporairement la forme soit d'un plateau, soit d'une légère hyperpolarisation avant de reprendre sa progression. La figure 24.B présente au contraire une dépolarisation franche et nette tout au long de la stimulation. En quelques occasions, ces dépolarisations ont été suivies d'une hyperpolarisation de la cellule.

Plus rarement encore, une cellule a pu réagir à la stimulation en une unique hyperpolarisation (Figure 25).

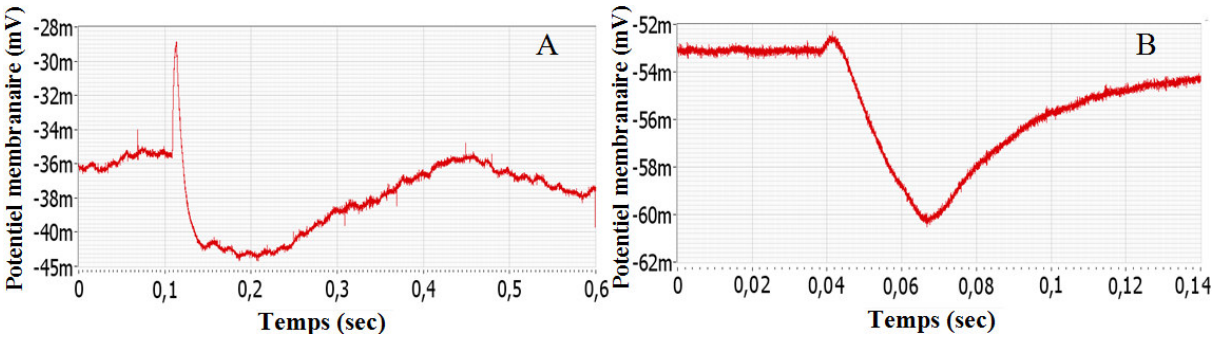


Figure 25 : Exemples de changement du potentiel de membrane avec hyperpolarisation.
A : réponse d'une CGR (λ = 1875 nm ; T = 5 ms). B : réponse d'une CGV (λ = 1535 nm ; T =5 ms).

Cette hyperpolarisation faisant suite à la dépolarisation de la cellule de la figure 25.A, a pu être observée sur les deux types cellulaires avec plus ou moins d'importance. Les relevés montrant uniquement une hyperpolarisation cellulaire ont été observés en deux occasions sur des cellules vestibulaires. A ces occasions, les cellules n'ont réagi à la stimulation optique que par cette unique forme de réponse.

b. Impact de la stimulation sur la durée et sur l'amplitude des dépolarisations.

Afin d'étudier l'effet de la stimulation sur les réponses cellulaires, nous avons observé leurs caractéristiques au cours des tests. L'un des premiers tests a été d'envoyer deux stimulations identiques dans un court laps de temps sur une cellule (Figure 26).

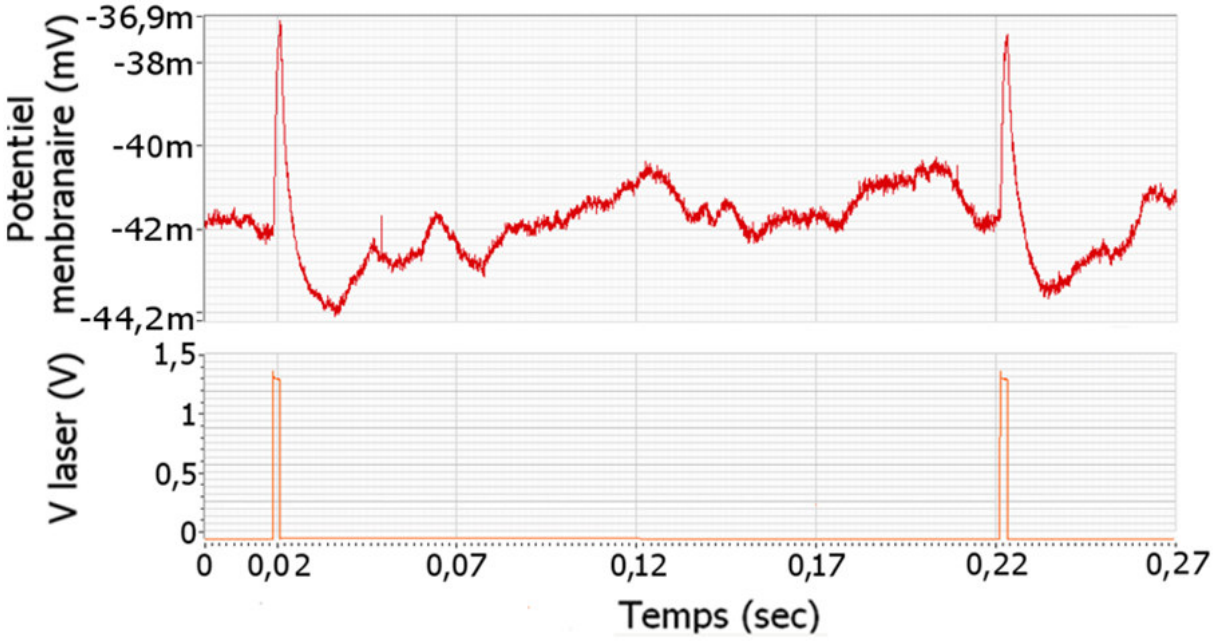


Figure 26 : Test de deux impulsions de stimulations consécutives sur des CGV. (λ = 1875 nm ; T = 2 ms).

Le résultat figurant sur la figure 26 permet en premier lieu, de confirmer l'effet de la stimulation laser sur le potentiel membranaire. De plus, il montre que les deux stimulations identiques consécutives sur la cellule donnent des amplitudes et des durées de dépolarisation égales. Ce test a été répété à plusieurs reprises et a permis de vérifier que malgré la variété de formes que prennent les réponses, la stimulation optique a une incidence sur l'amplitude et la durée des dépolarisations (Figure 27).

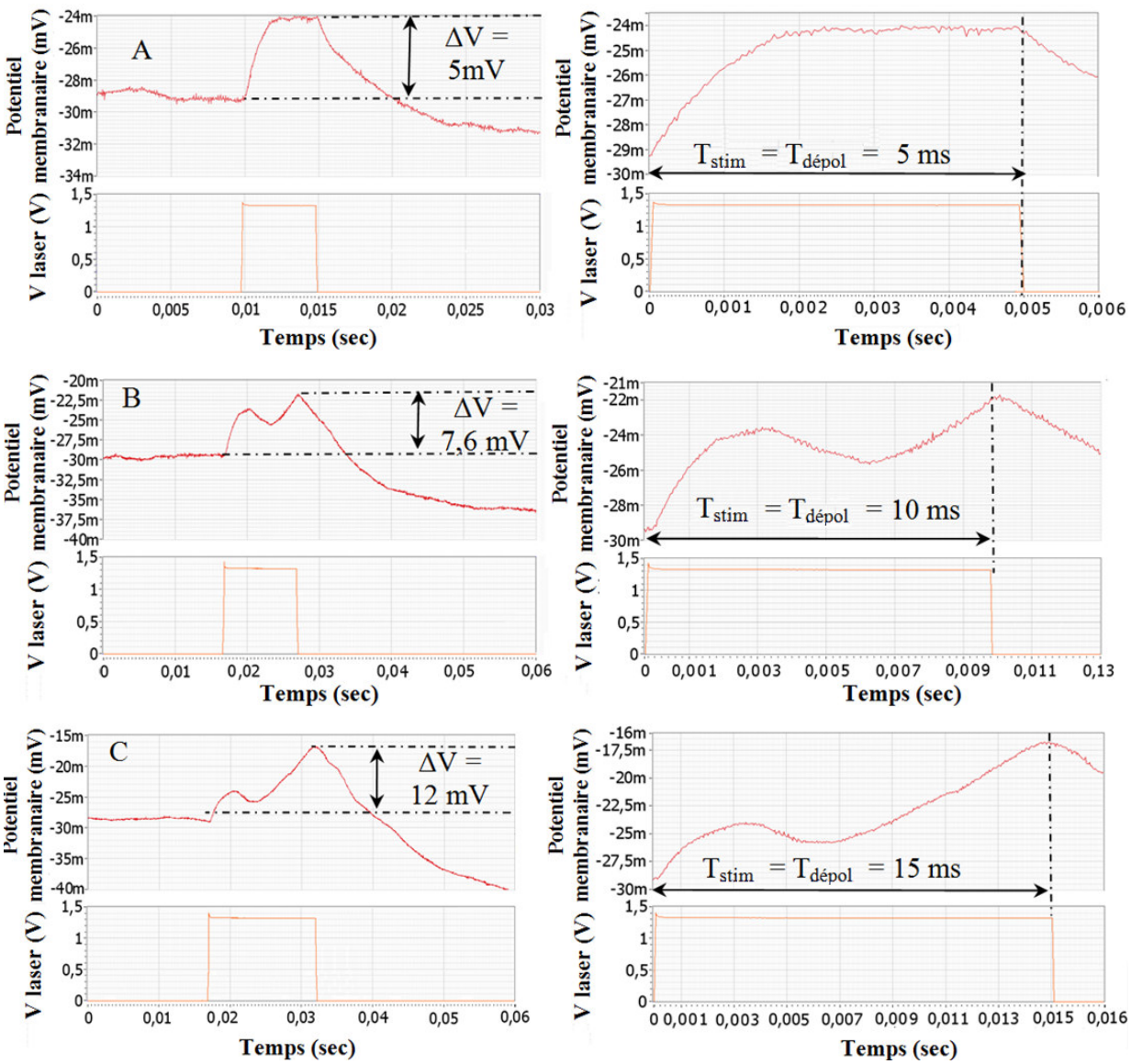


Figure 27 : Etude de l'impact de la variation du temps de stimulation sur les réponses cellulaire de CGR. Les figures placées à droite correspondent à l'agrandissement de la zone de l'impulsion laser. (λ = 1875 nm).

A : dépolarisation de 5 mV pour une stimulation de 5 ms. B : dépolarisation de 7,6 mV pour une stimulation de 10 ms. C : dépolarisation de 12 mV pour une stimulation de 15 ms.

Il apparaît sur la figure 27 qu'au cours de la stimulation optique, la dépolarisation de la cellule a une durée équivalente à la durée de l'impulsion.

Sur chacun des grossissements des figures 27.A, 27.B, et 27.C situés à droite de celles-ci, il apparaît que la cellule réagit dès le début de la stimulation et revient à son potentiel de repos dès l'arrêt de celle-ci.

Une autre propriété inhérente au temps de stimulation est l'impact sur l'amplitude maximum de la dépolarisation. Ainsi, des temps de stimulation de 5, 10 et 15 ms donnent tour

à tour des dépolarisations de 5, 7,2 et 12 mV sur une même cellule. Ces amplitudes ne sont valables que dans le cas de la cellule testée. Chaque cellule réagit plus ou moins à la stimulation envoyée suivant sa viabilité et son placement dans le faisceau lumineux. Néanmoins, la tendance générale de toutes les mesures effectuées sur des CGR et CGV aux différentes longueurs d'onde indique que l'amplitude est plus importante pour des temps de stimulation longs, c'est-à-dire à des niveaux d'énergies plus élevés (Figure 28).

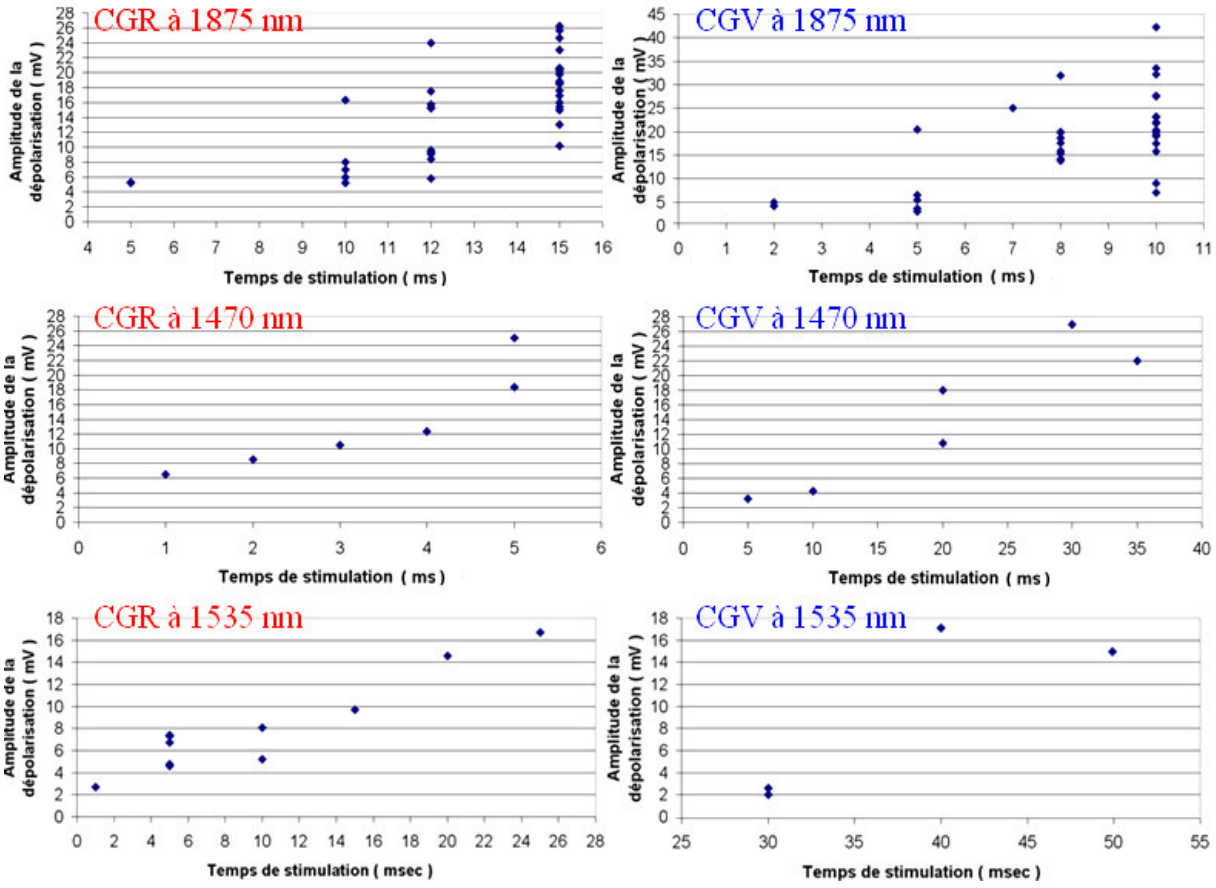


Figure 28 : Amplitude des dépolarisations en fonction des temps de stimulation sur des CGR et des CGV suivant la longueur d'onde employée.

c. Potentiel d'action.

Les dépolarisations engendrées par la stimulation laser peuvent être suivies d'un potentiel d'action. Dans cette partie sont détaillés les PA obtenus sur des CGV et des CGR. La plupart ont été observés au cours des stimulations avec le laser de 1875 nm, les autres longueurs n'ayant pas pu faire l'objet d'un nombre de tests suffisant.

On reconnaît un potentiel d'action à la variation brutale du potentiel au cours de la dépolarisation. Nous avons choisit, pour différencier un potentiel d'action d'une dépolarisation, la mesure de la largeur à mi-hauteur du PA inférieur à 2 ms. D'autres méthodes peuvent utilisées [69]. Certaines cellules ont montré les capacités de générer des PA spontanément, c'est à dire sans être soumise à une excitation externe. Il est à remarquer que ce sont les cellules montrant ces caractéristiques qui ont le mieux répondu à la stimulation laser. Un des effets de la stimulation laser qui a été observé est la faculté à accentuer la fréquence d'apparition de ces potentiels spontanés (Figure 29).

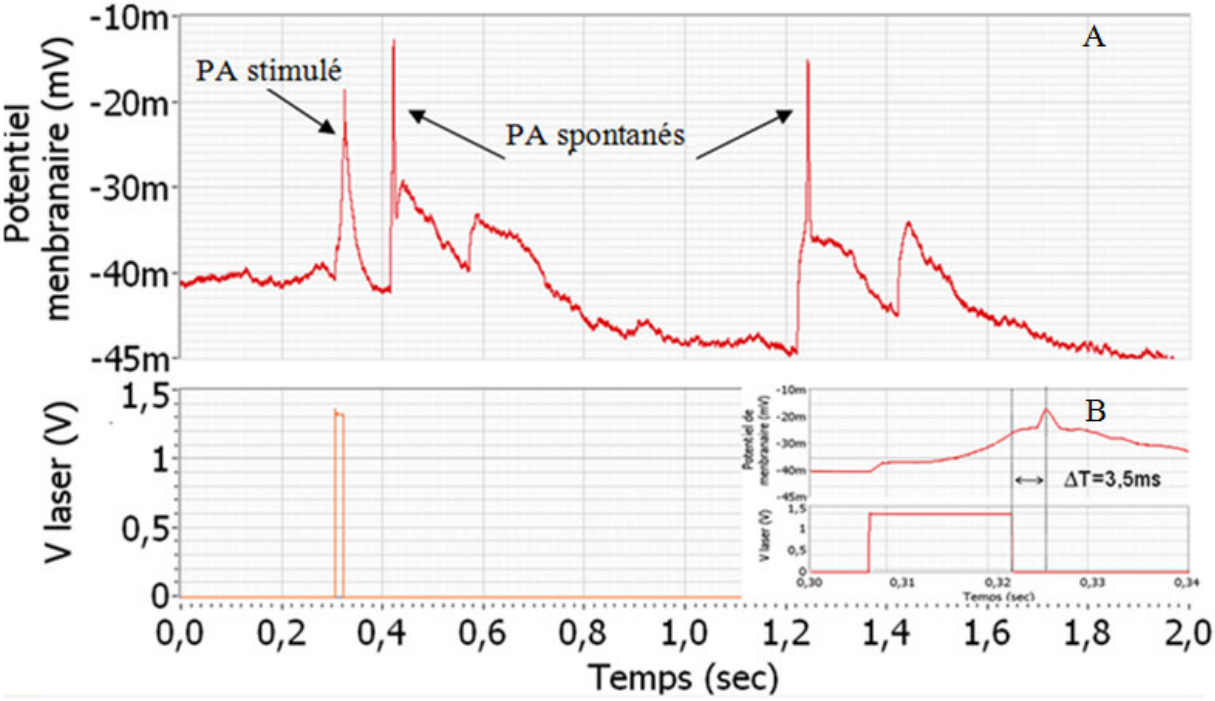


Figure 29 : Potentiel d'action d'une CGR généré par une stimulation laser entrainant l'apparition de potentiel spontané.
A : Enregistrement complet du test. B : Grossissement du PA et de la stimulation.

Il n'est ainsi pas rare de voir apparaître des PA spontanés après une dépolarisation ou un PA provoqué par une stimulation laser comme celle de la figure 29. Comme dans le cadre B de la figure 29, un temps de retard, qui n'a jamais excédé les 7 ms, peut être observé entre la fin de la stimulation et l'apparition du PA. Néanmoins, il arrive que certains PA apparaissent avant la fin de la stimulation (Figure 30).

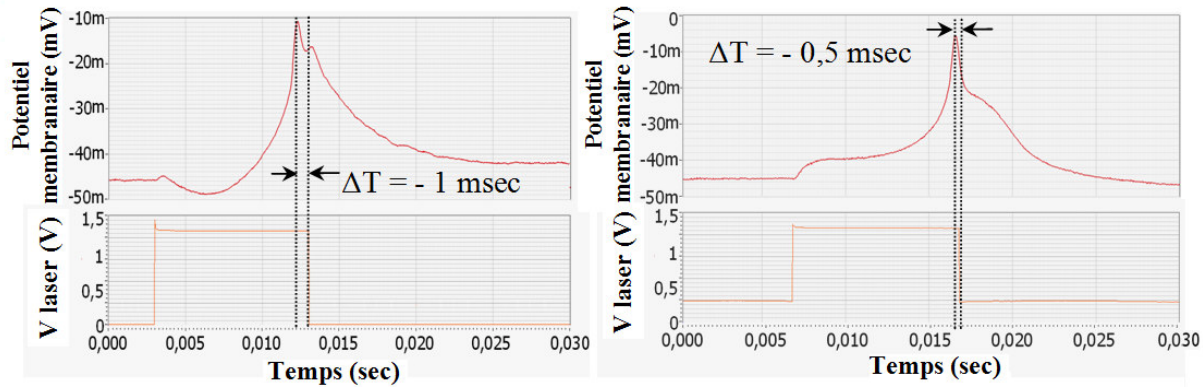


Figure 30 : Potentiel d'action de cellule vestibulaire apparaissant avant la fin de la stimulation (λ = 1875 nm ; T =15 ms).

Si les PA visualisés avec les deux types de cellules présentent des formes identiques dans la phase ascendante, la différence semble se trouver dans la phase descendante de retour au potentiel de repos. Les CGR et les CGV possèdent des formes différentes pendant cette phase (Figure 31).

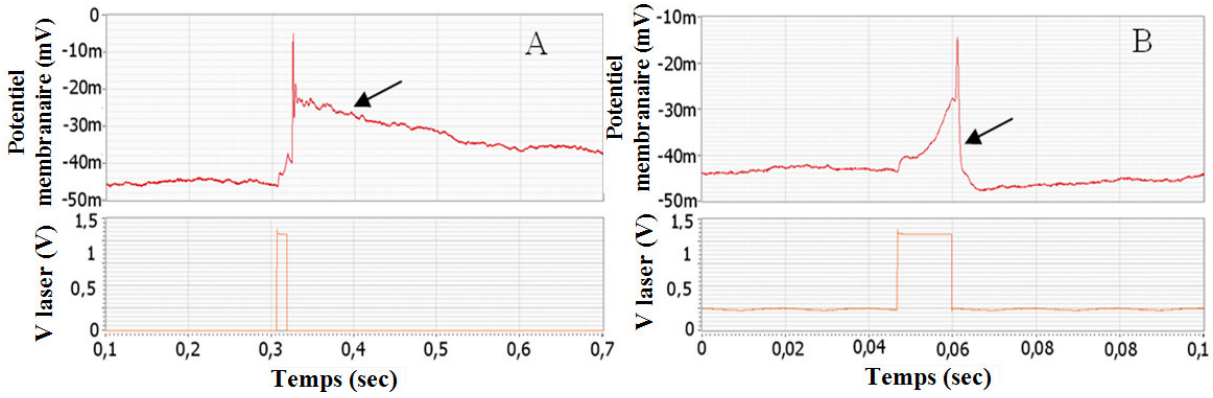


Figure 31 : Différence entre un PA du CGR (A) et d'une CGV (B). Les flèches pointent la zone qui correspond à la phase de récupération de la cellule.

Comme l'indique la figure 31.A, les cellules rétiniennes mettent plus de temps à redescendre à l'équilibre que les cellules vestibulaires dont la forme est indiquée sur la figure 31.B. Cette différence ne semble pas être liée à la stimulation optique. En effet, l'étude de l'allure des potentiels spontanés de ces cellules montre qu'ils possèdent aussi cette caractéristique.

3.2.2.3. Détermination des seuils d'énergie

Pour cette partie portant sur la détermination des seuils d'énergie, seules les réponses de type potentiel d'action ont été prises en considération. S'il est vrai que les simples dépolarisations enregistrées correspondent à une réponse cellulaire, seuls les potentiels d'action sont à même de transférer un influx nerveux au cerveau. Dans cette partie, seulement les seuils d'énergie de stimulation ayant déclenchés un PA sont présentés.

Ainsi, nous comparons les seuils obtenues sur des cultures de CGR et de CGV à 1875 nm ainsi que les différences observées en utilisant les lasers de 1535 nm et 1470 nm. Toutes les mesures réalisées au cours des tests électrophysiologiques ont été effectuées à une puissance optique constante avec les trois lasers, soit 230 mW pour λ = 1875 nm, 430 mW pour λ = 1535 nm et 450 mW pour λ = 1470 nm.

Conformément au paragraphe du même nom de la partie imagerie, les résultats sont donnés conjointement sous la forme de l'énergie utilisée en sortie de fibre et de l'énergie réellement reçue par la cellule en fonction des temps de stimulation utilisés.

a. Seuil de stimulation.

Au cours des différents tests réalisés, la longueur d'onde de 1870 nm a permis d'obtenir des PA sur les cultures de CGR et CGV. Les valeurs de seuils d'énergie de stimulation présentées correspondent à la réponse de deux CGR et de deux CGV. Pour chacun des deux tests, les cellules testées appartenaient au même milieu de culture. Ce test permet d'observer la différence de valeur de seuil pouvant exister entre deux cellules alors que l'angle d'inclinaison et la position de la fibre restent identiques (Figure 32).

Cet écart de valeur vient probablement de l'état physiologique différent des cellules et/ou d'un infime décalage en x ou y entre le placement respectif dans le faisceau des deux cellules.

L'utilisation d'une puissance optique constante et le faible nombre de réponses de type PA enregistrées (par manque de temps) ne permet pas une étude de la variation du seuil en fonction du temps de stimulation aussi complète que celle présentée en imagerie de fluorescence. Nous remarquerons simplement qu'à puissance et temps égal, nous obtenons des seuils équivalents à ceux trouvés en imagerie de fluorescence calcique.

Sur la figure 32.B, la valeur des seuils est plus importante pour les CGV que les CGR du fait de leurs différences de taille.

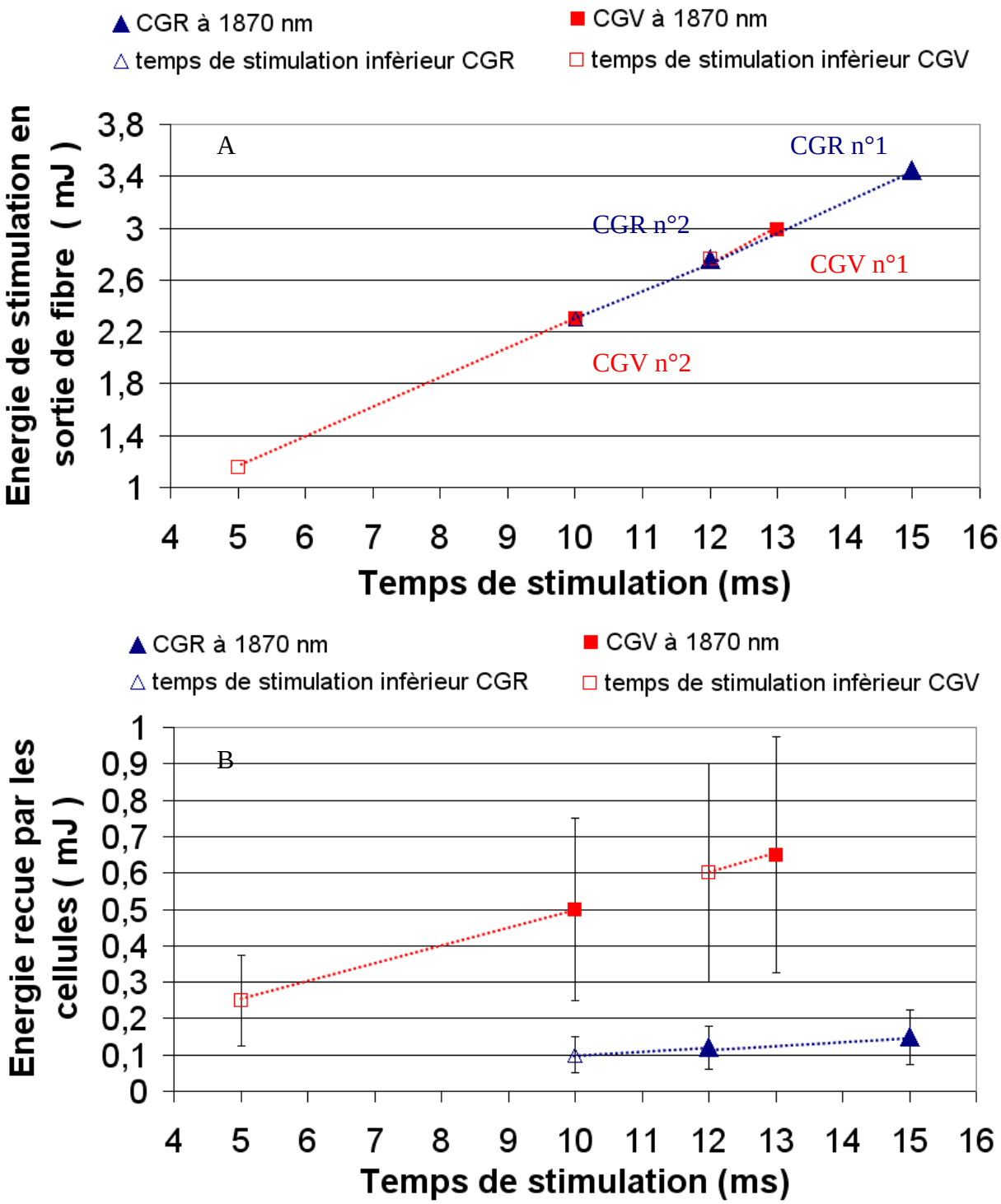


Figure 32 : Seuils d'énergie de stimulations obtenues pour les deux modèles biologiques. (λ = 1875 nm ; Pconstante = 230 mW).

A : Seuil d'énergie en sortie de la fibre optique. B : Seuils d'énergies calculés au niveau de la cellule. L'erreur correspond la gamme d'énergie reçue par la cellule suivant sont placement dans le faisceau et de l'angle d'inclinaison de la fibre.

b. Effet de la longueur d'onde.

Les trois longueurs d'onde ont permis d'obtenir des PA sur un neurone. Les CGR ont répondu à la stimulation des lasers à 1875 nm et 1470 nm, les CGV aux lasers de 1875 et de 1535 nm (Figure 33).

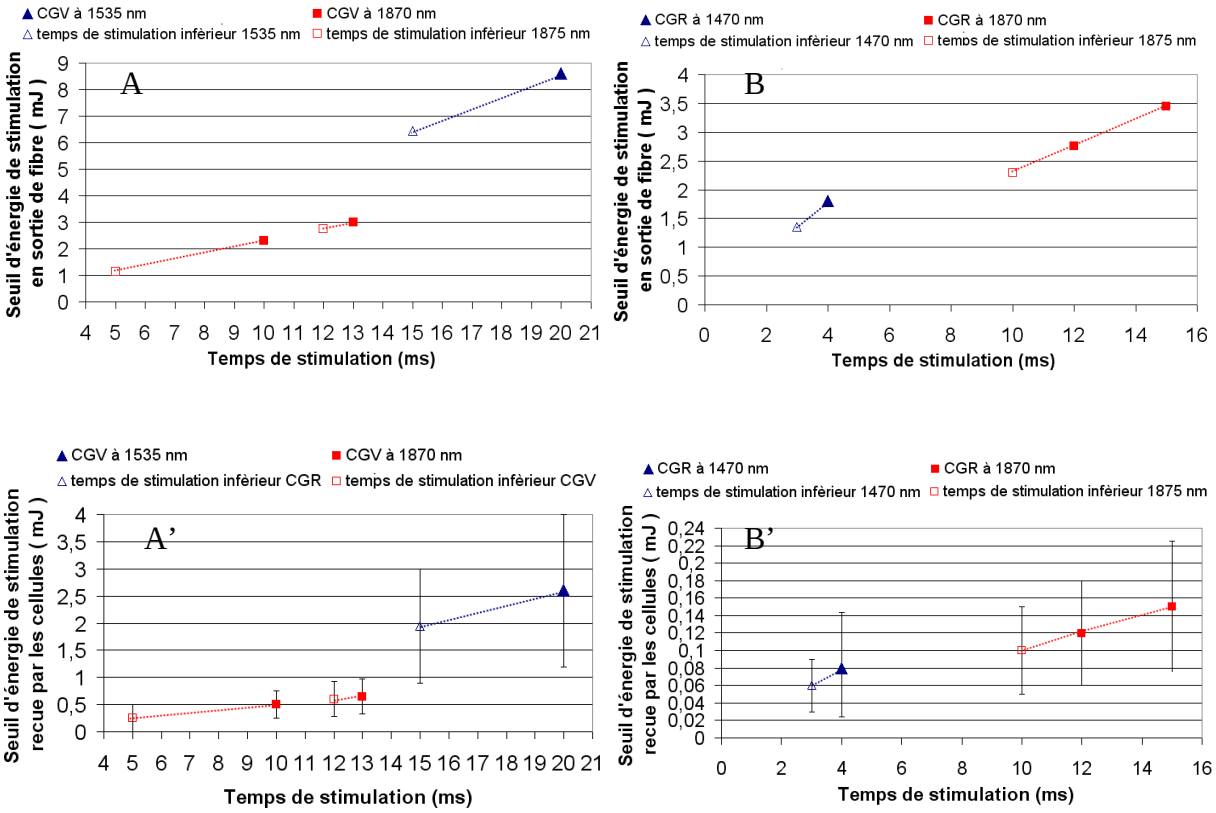


Figure 33 : Seuils d'énergie d'excitations obtenues pour les trois longueurs d'onde.
A et A': Seuils d'énergies calculés en sortie de fibre et au niveau de la cellule à 1875 nm et 1535 nm pour des CGV. B et B' : Seuils d'énergies calculés en sortie de fibre et au niveau de la cellule à 1875 nm et 1470 nm pour des CGR. La barre d'erreur correspond à l'énergie reçue par la cellule suivant son placement dans le faisceau et de l'angle d'inclinaison de la fibre.

Il semble que l'on retrouve les résultats décrits dans la partie imagerie, bien que le manque de points ne permette pas de distinguer des tendances plus précises.

Sur les figures 33.A et 33.A' où sont indiqués les seuils d'énergie en sortie de fibre et sur la cellule vestibulaire, on retrouve une différence des valeurs seuils entre les lasers de 1535 et 1875 nm du même ordre que celle trouvée en imagerie. Ce résultat tend à confirmer que le coefficient d'absorption a une incidence directe sur la valeur des seuils d'énergie de stimulation

Pour les CGR, comme pour les mesures d'imagerie, il semble que les seuils observés pour les lasers de 1470 nm et 1875 nm indiquent une décroissance de l'énergie qui va de pair avec la diminution du temps de stimulation obtenue pour le laser plus puissant (à 1470 nm). Nous rappelons que ces deux longueurs d'onde ont des coefficients d'absorption quasiment identiques dans l'eau.

Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que nous avons atteint notre objectif en faisant la démonstration de la stimulation contrôlée non destructif de neurones de la rétine par une lumière laser infrarouge. Nous avons confirmé ces résultats sur des neurones provenant non seulement de culture, mais aussi de tranche de rétine, arrangement biologique se rapprochant du modèle in-vitro.

Ces réponses biologiques ont été observées par la mesure de variations d'échanges ioniques transmembranaires réalisée par deux méthodes de mesures : l'imagerie de fluorescence des ions calciums et des mesures électrophysiologiques par la technique du patch clamp.

Les tests d'imageries nous ont permis de calibrer notre banc de mesure et d'optimiser les paramètres du signal de commande de stimulation. Une stimulation optique a permis d'enregistrer des réponses calciques des cellules ganglionnaires du vestibule et de la rétine issue de culture et de tranches de rétines. Nous avons aussi déclenché des réponses calciques sur les cellules gliales présentes en très grand nombre dans les cultures vestibulaires.
Les réponses électrophysiologiques montrent qu'un laser peut entraîner la génération d'un potentiel d'action au niveau des cellules rétiniennes et vestibulaires. Ce résultat fondamental pourrait prouver qu'une stimulation laser devrait permettre la transmission d'une information au cerveau via le nerf optique ou auditif. La preuve de la réception de l'information par le cerveau devra être apportée par les tests in vivo à venir.

Ces résultats ont permis d'établir des seuils d'énergie de stimulation de quelques mJ pour les trois longueurs d'ondes sur les trois types de modèle utilisés et avec les deux techniques de mesures.
Les résultats montrent qu'à une longueur d'onde donnée, les seuils relevés sur des cellules de la rétine et du vestibule sont de valeurs équivalentes. Il apparaît aussi clairement que ces seuils de stimulation dépendent directement de l'absorption par l'eau de la longueur d'onde employée. Ainsi, plus la longueur d'onde employée a un coefficient d'absorption dans l'eau élevé, plus le seuil d'énergie de stimulation est faible.

L’évolution des seuils d’énergie de stimulation dans la gamme de puissance disponible pour nos tests montre qu’ils baissent au fur et à mesure de la diminution des temps de stimulation.
Enfin, l’étude de l’impact du positionnement de la fibre montre que la stimulation laser permet une très bonne sélectivité spatiale. Cette précision est renforcée par la forme gaussienne du faisceau en sortie de fibre optique qui permet d’obtenir une zone active d’un diamètre situé au alentour des 100 µm qui permet la stimulation d’un nombre réduit de cellule (4 ou 5 cellules rétiniennes au maximum).

Enfin, nous ne retrouvons pas les mêmes valeurs pour l’énergie que celles trouvées dans la littérature, ce qui se justifie aisément en considérant les très grandes différences entre les expérimentations.

Chapitre 4 : Etude des mécanismes d'interaction laser-neurone.

Introduction

Ce chapitre traite des phénomènes physiques et biophysiques qui peuvent apparaître lors de la stimulation laser et provoquer la réaction du neurone.

La première partie est consacrée aux mécanismes physiques de l'interaction laser-tissu. Les mécanismes de transfert d'énergie entre la lumière et le tissu biologique y sont détaillés et classés suivant les gammes de puissance et de temps d'exposition nécessaires à leur apparition.

La deuxième partie explique les raisons qui conduisent à formuler l'hypothèse d'un effet thermique comme mécanisme prépondérant dans l'excitation optique de neurone que nous mettons en jeu avec les lasers infra-rouge utilisés. Nous verrons que cette forte présomption est partagée par d'autres équipes de recherche.

La troisième partie est consacrée à l'étude préliminaire des mécanismes biologiques responsables de la réaction cellulaire lors de la stimulation laser. Quelles réponses physiologiques apporte la cellule au cours d'une stimulation optique ? A quoi est-elle sensible ? Et plus précisément : quels canaux situés sur la membrane cellulaire permettent l'échange d'ions nécessaire à la réponse cellulaire ? Autant de questions auxquelles il est possible de répondre au moyen de tests pharmacologiques. L'utilisation de bloqueurs spécifiques à certains canaux, par exemple des canaux sensibles au voltage, sensible à la chaleur …, permet de déterminer précisément les mécanismes biophysiques mis en jeu.

Nous consacrons la dernière partie au calcul de l'augmentation de la température induit par le pulse laser dans notre configuration. Des simulations que nous avons réalisées par un logiciel de calcul numérique sont présentées en utilisant les paramètres des stimulations pour les trois longueurs d'onde des tests.

4.1. Etude de l'interaction du laser avec le tissu.

Lorsqu'un faisceau laser entre en contact avec du tissu biologique, plusieurs mécanismes d'interactions peuvent intervenir [70, 71, 72]. Ces mécanismes varient suivant l'énergie cédée par la lumière du laser aux différentes molécules formant le tissu traversé. Une cellule est composée principalement d'eau (70 %), de protéines (18 %) et de lipides (5 %). Ainsi, l'absorption d'énergie varie suivant le tissu à traiter (coefficients optiques, paramètres thermiques et coefficients de la réaction de dénaturation thermique) et suivant les paramètres du laser (longueur d'onde, puissance, temps et mode d'émission, forme du faisceau et surface du spot). Suivant la valeur de ces paramètres, des phénomènes photochimiques, photomécaniques, thermiques ou de photoablation peuvent être mis en jeu durant l'interaction laser avec un tissu biologique (Figure 1).

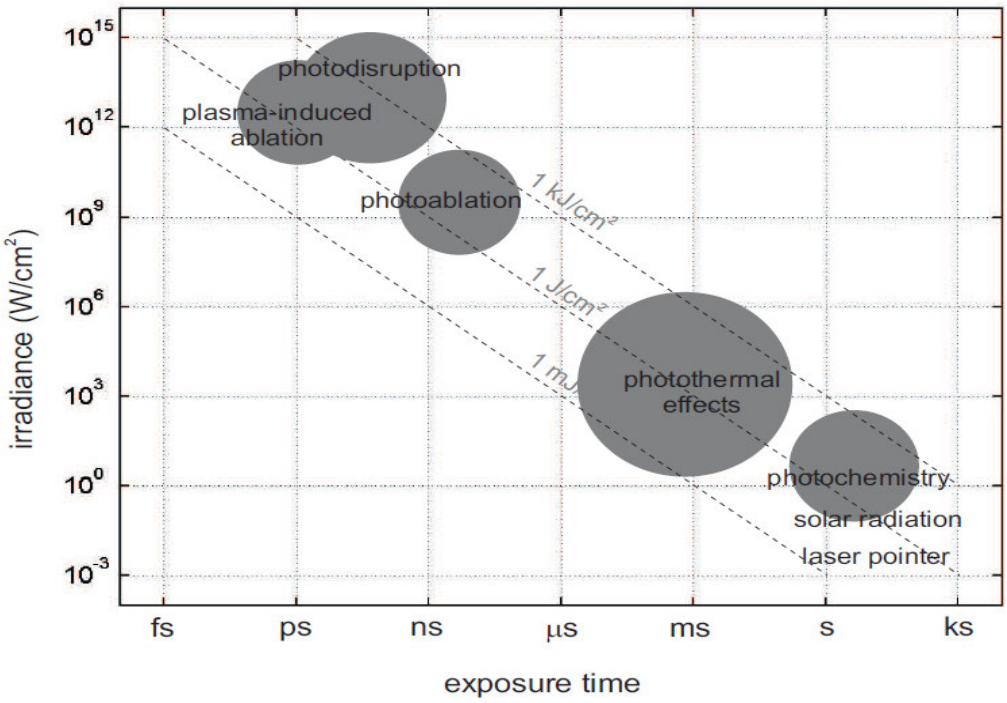


Figure 1 : Vue des différents types d'interaction laser-tissu suivant la variation du temps de stimulation et de la densité de puissance utilisée (D'après : Cox [71]).

4.1.1. Effet photochimique.

Cet effet décrit une réaction chimique du tissu lors d'une exposition à une excitation optique de faible intensité. L'énergie absorbée par une molécule lui permet de changer d'état (excitation électronique, oxydation, coupure de liaison de valence, etc.). Très connu chez les plantes avec la photosynthèse, ce phénomène permet chez l'homme par exemple, la production de vitamine D à partir du cholestérol au niveau de la peau [73]. Cet effet se produit pour de faibles densités de puissance (quelques dizaines de W/cm^2) et de longues durées d'exposition (de l'ordre de la dizaine de minutes). La transduction réalisée au niveau des photorécepteurs de la rétine dépend entièrement de la réaction photochimique de la lumière et des pigments au niveau des cônes (iodopsine) et des bâtonnets (rhodopsine). La principale utilisation de la photochimie dans la médecine est la thérapie photodynamique (PDT), qui est utilisée pour traiter les cancers [74].

4.1.2. Effet thermique.

Sous une stimulation optique de plus forte intensité, les tissus vont subir une augmentation de leur température. Les effets thermiques peuvent être modélisés par un processus à trois étapes successives (Figure 2) :

• La première étape permet la transformation de 1'énergie lumineuse en source de chaleur par absorption.

• La seconde, thermique, où 1'énergie est transportée dans le tissu par transfert de chaleur entraînant une élévation de la température tissulaire.

• La dernière est biologique. L'élévation de température induit une réaction des constituants tissulaires pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

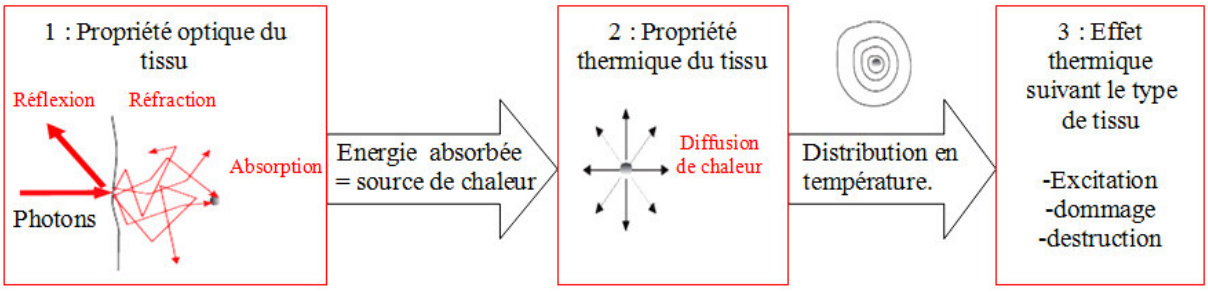


Figure 2 : Schéma des trois étapes de l'action thermique (D'après : Cox [71]).

Lorsque le rayonnement atteint la surface du tissu, une partie peut être réfléchie en fonction de sa longueur d'onde et de la nature de la surface des tissus. Ce phénomène important dans le visible, tend à diminuer considérablement pour des longueurs d'onde supérieures. Une autre partie du rayonnement se propage dans le tissu et va, soit le traverser, soit être absorbé et/ou diffuser par les constituants tissulaires. Lors du phénomène d'absorption, les photons sont absorbés par une molécule en lui cédant son énergie et lui font atteindre un certain état d'excitation qui se traduit par une augmentation de la température. La quantité de chaleur générée dans le matériau dépend donc des coefficients d'absorption, de réflexion et de diffusion du tissu, tous dépendant de la longueur d'onde employée. L'étude du spectre d'absorption de trois constituants des tissus montre l'importance du choix de la longueur d'onde (Figure 3).

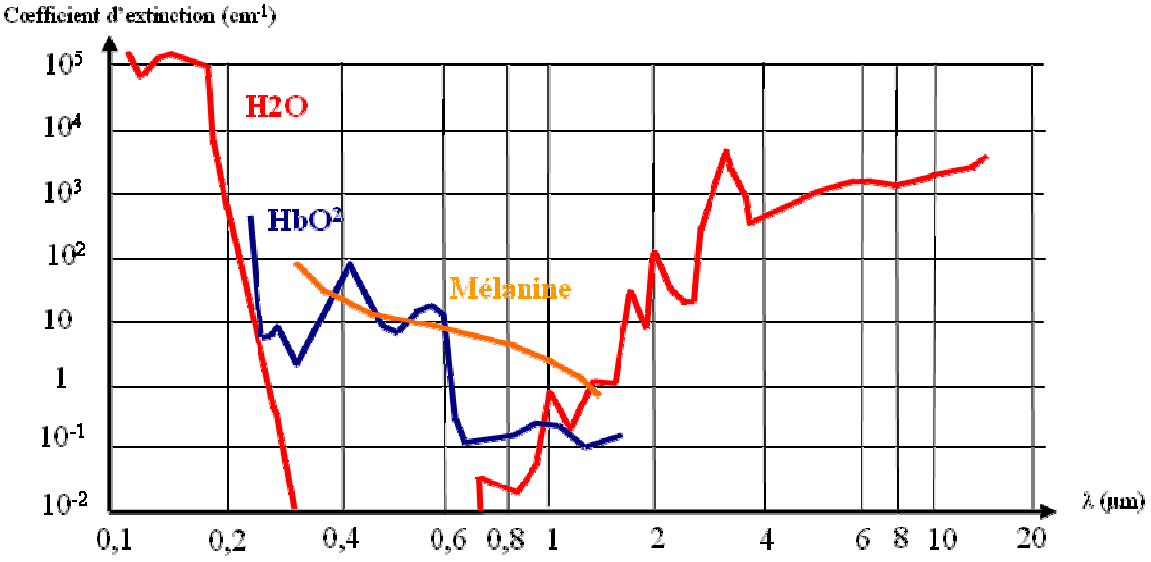


Figure 3 : Spectre d'absorption des trois principaux chromophores de la peau : eau, hémoglobine et mélanine (D'après : J. M. Brunetaud [70]).

La chaleur générée par absorption va ensuite se répartir dans le tissu. Cette répartition peut être due à trois modes de transfert thermique :

- La convection : Elle correspond au transfert d'énergie par un déplacement de matière. Par exemple, la rétine est un tissu très vascularisé. Une étude a été consacrée à l'évolution de la température de la rétine d'un lapin soumise à un éclairement laser continu [75]. Elle a montré que la température augmente de quelques degrés avant de se stabiliser, dans le cas d'un lapin vivant. Dans le cas d'un lapin mort, on constate une augmentation continue de la température avec la quantité d'énergie déposée sans aucune régulation.

- La conduction : Il s’agit d’un transfert d'énergie par interaction des particules du tissu. Ce transfert se fait aléatoirement des particules les plus énergétiques vers celles qui le sont moins et aboutit à un volume chauffé "secondaire " plus volumineux que la source "primaire " où s'est effectuée la conversion de la lumière en chaleur.
- Le rayonnement (radiation) : tout objet possédant une température au dessus du zéro absolu irradie de l’énergie sous forme électromagnétique. Dans notre cas, compte tenu de la gamme des températures atteintes, ce mode de transmission thermique est négligeable devant les effets de conduction, de même que la convection, tant que nous travaillons sur des cellules in vitro [70].

Les effets thermiques sur les tissus dépendent de l’élévation de température et du temps de stimulation (Figure 4).

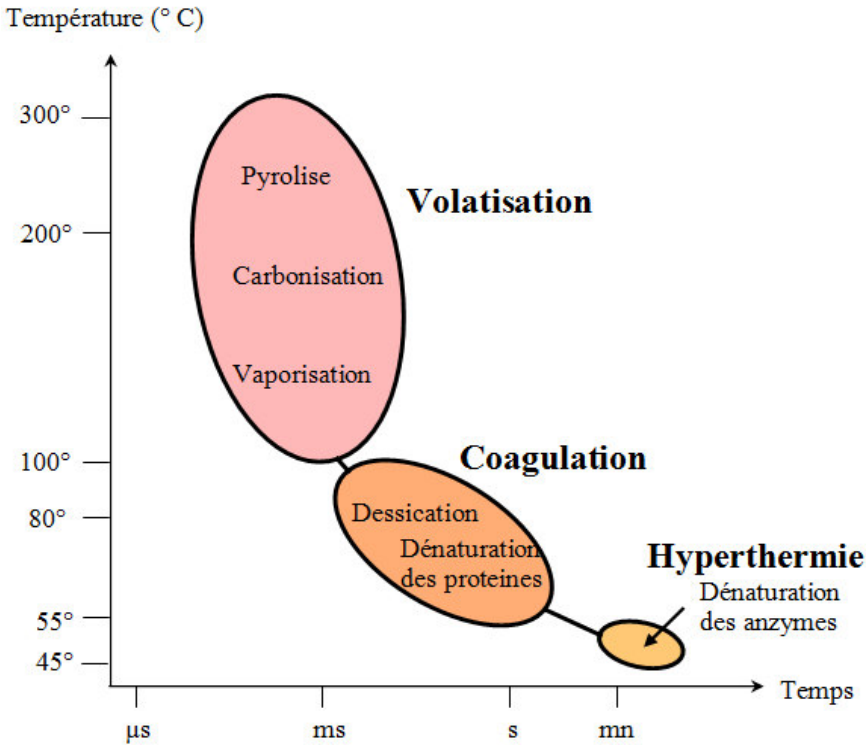


Figure 4 : Effet thermique dans un milieu biologique, en fonction du temps d’exposition (D'après : J. M. Brunetaud [70]).

L’élévation de température doit être étudiée en prenant en considération le temps de stimulation, de manière à éviter les effets thermiques nocifs pour le tissu à des températures trop élevées.

4.1.3. Effet de photoablation.

Le phénomène de photoablation ou « photodécomposition ablative » est obtenu pour de très fortes énergies concentrées en un point réduit. Il permet de casser les liaisons chimiques des atomes sans génération de chaleur au point d'impact en limitant ainsi les dommages thermiques sur les tissus périphériques. Cet effet est obtenu avec des lasers très énergétiques, principalement des lasers ultraviolets, ou des lasers infrarouges de type pulsés.

4.1.4. Effet mécanique.

Des flux lumineux très intenses (10^{10} à 10^{12} W/cm^2) et concentrés sur de petites surfaces induisent une ionisation des atomes et la création d'un plasma. A la frontière entre milieu ionisé et milieu externe apparaît un gradient de pression qui induit la propagation d'une onde de choc. C'est l'expansion de cette onde de choc qui provoque un effet destructif. Lorsque la durée du tir laser est inférieure au temps caractéristique de diffusion thermique de la cible, il se produit un confinement thermique avec accumulation de chaleur sans diffusion thermique. Si on ajoute un confinement mécanique au confinement thermique, on empêche la vaporisation explosive de se produire, et on crée une bulle gazeuse qui va imploser, créant le phénomène de cavitation.

4.2. Hypothèses de mécanismes d'interaction lors de la stimulation laser de neurone.

Si les résultats des différentes équipes prouvent qu'une stimulation optique IR peut induire une réponse neuronale, les mécanismes biophysiques sont encore incertains. La plupart des équipes émettent l'hypothèse d'un mécanisme thermique. J. Wells, notamment, a considéré les différents mécanismes biophysiques pouvant apparaître au cours de la stimulation [57]. Les mesures réalisées permettent de conclure que la contribution du champ électrique ou d'un effet photo chimique ne sont vraisemblablement pas à l'origine de l'excitation neuronale. S'il n'explique pas les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse du nerf sciatique à une excitation optique, il émet l'hypothèse d'un processus photo thermique. Néanmoins, il n'exclut pas la contribution du mouvement thermo-élastique du tissu induit par la pression de l'onde du laser qui serait un effet indirect d'origine thermique. Ces conclusions sont basées sur des mesures réalisées avec une caméra thermique qui a

permis d'observer la variation de température au cours de la stimulation. Dix huit mesures à différentes énergies ont été réalisées et ont montré une linéarité de l'augmentation de la température par rapport au temps de stimulation. Ces tests menés avec un laser de 2,2 µm donnent un seuil d'énergie de stimulation qui correspond à un seuil thermique d'excitation équivalent à une augmentation de 6 °C. L'augmentation de température maximum observée est de 8,66 °C.

Les mesures effectuées avec une caméra thermique montrent que le temps de relaxation (temps que met le signal pour redescendre à 37 % du maximum atteint) est de 100 ms environ. Des durées de stimulation inférieures à 100 ms permettent une meilleure localisation du dépôt d'énergie. Un intervalle de 200 ms semble nécessaire pour éviter une accumulation de la chaleur et une dégradation du tissu lors de temps de stimulation. Le seuil d'énergie d'excitation ne dépend pas de la durée de l'impulsion tant que cette durée est assez courte pour réduire au minimum la diffusion de la chaleur et respecter la condition du confinement thermique.

Des études similaires ont été menées par l'équipe de Walsh pour deux autres longueurs d'onde : 1,855 µm et 1,94 µm [65, 59].

Pour chaque seuil excitateur validé, un calcul de l'élévation de température en fonction de l'énergie déposée au niveau de la surface du spot est réalisé (Figure 5). Au cours de la stimulation de la cochlée avec un laser de 1,855 µm, les calculs donnent une augmentation maximale de 0,75 °C pour une durée d'impulsion de 1 ms [65].

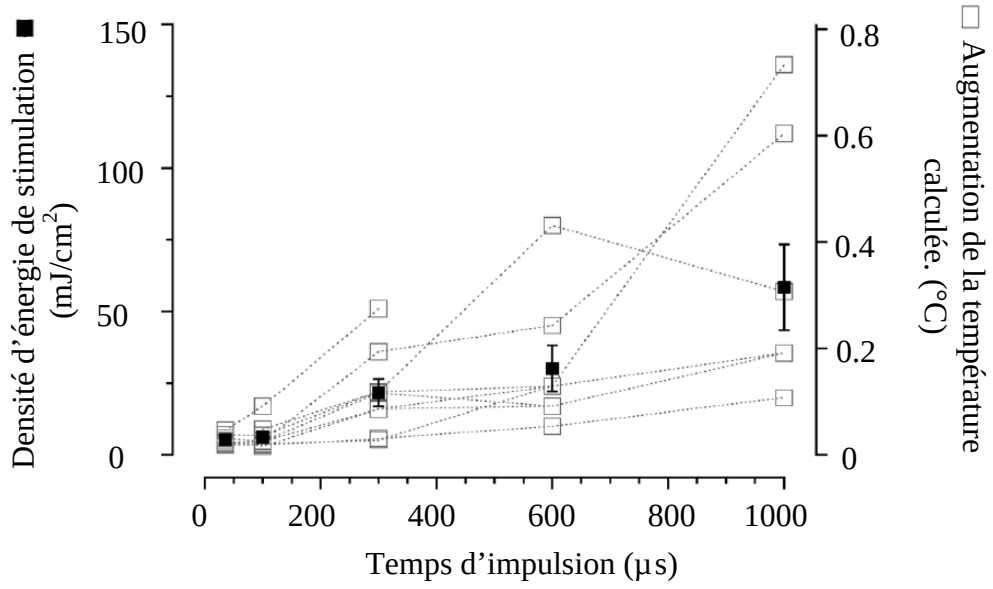


Figure 5 : Seuil de stimulation en énergie et en température pour différents temps de stimulation pour une longueur d'onde non précisée, mais comprise entre 1,844 et 1,873 µm (D'après : Izzo [65]).

A 1,94 μm, l'utilisation d'une énergie de stimulation de 5 mJ/cm² donne une augmentation de température calculée de 0,15 °C en sortie de fibre ou de 0,08 °C au niveau du neurone [59]. Les résultats montrent une répétabilité des réponses neuronales pour des seuils d'énergies non destructifs.

Dans une étude récente de S. Liang, des tests ont prouvé que l'utilisation d'un laser de 980 nm provoque une augmentation de la réponse d'un neurone issu de culture de l'hippocampe prélevé chez le rat. Pour cette étude, les auteurs ont réalisé des mesures préalables des courants calciques en contrôlant la température du milieu physiologique. Ils montrent que l'amplitude des signaux émis spontanément par les cellules augmente avec la température. Cette étude montre qu'en augmentant l'énergie de stimulation laser, l'amplitude des signaux spontanés augmente également. Les auteurs suggèrent qu'une mesure de l'amplitude des signaux permet de quantifier la température au niveau des cellules [76]. Une puissance de 73 mW provoque ainsi une augmentation locale de la température de 14 °C. Cette augmentation ne semble pas provoquer de dommage à la cellule qui revient à sa température initiale et à des amplitudes de courants calciques normales rapidement. Néanmoins, cette étude n'identifie pas clairement le mécanisme biophysique déclencheur et n'indique pas les types de canaux ioniques impliqués.

Les différentes équipes de recherche que nous venons de citer semblent toutes mettre en avant un effet thermique prépondérant pouvant expliquer la réaction des cellules à une stimulation laser dans l'infrarouge.

En ce qui concerne nos résultats, en considérant les valeurs de seuils minimales et maximales de densité de puissance de stimulations reçues par les cellules au cours de nos propres tests, nous obtenons des valeurs comprises entre $2{,}8.10^3$ W/cm^2 et $13{,}7.10^3$ W/cm^2 correspondant à la zone où des effets photo thermiques apparaissent (voir figure 1 de la partie 4.1.1). Devant la forte présomption concernant l'effet thermique dans la réaction cellulaire, nous avons voulu étudier les mécanismes biophysiques mis en jeu lors de la stimulation laser en déterminant si des canaux dépendant de la température sont activés. Nous nous sommes enfin intéressés à l'élévation de température au cours d'une telle stimulation au niveau cellulaire en simulant l'échauffement induit dans de l'eau. Ces deux études sont présentées dans la suite du chapitre.

4.3. Identification des mécanismes biophysiques mis en cause.

Nous avons cherché à identifier les mécanismes biophysiques mis en cause en isolant les canaux cellulaires activés (Figure 6). Au cours de la stimulation laser, une augmentation transitoire de la température peut exercer par exemple une contrainte mécanique sur des canaux calciques et les forcer à prendre une configuration permettant l'entrée du calcium extracellulaire à l'intérieur de la cellule. Une autre possibilité consisterait à prendre en considération la participation d'un type de canaux calciques spécifiquement sensible à la variation de température. Dans ce cas, la variation de température créée lors de la stimulation optique provoquera l'ouverture de ces canaux qui laisseront les ions calcium rentrer dans la cellule. Dans les deux cas, l'entrée de ces ions extérieurs provoquera un changement de potentiel membranaire qui, suivant son importance, déclenchera l'ouverture d'une catégorie de canaux sensibles au voltage. Il s'ensuivra, si la cellule est viable, l'apparition d'une réponse calcique ou d'un potentiel d'action.

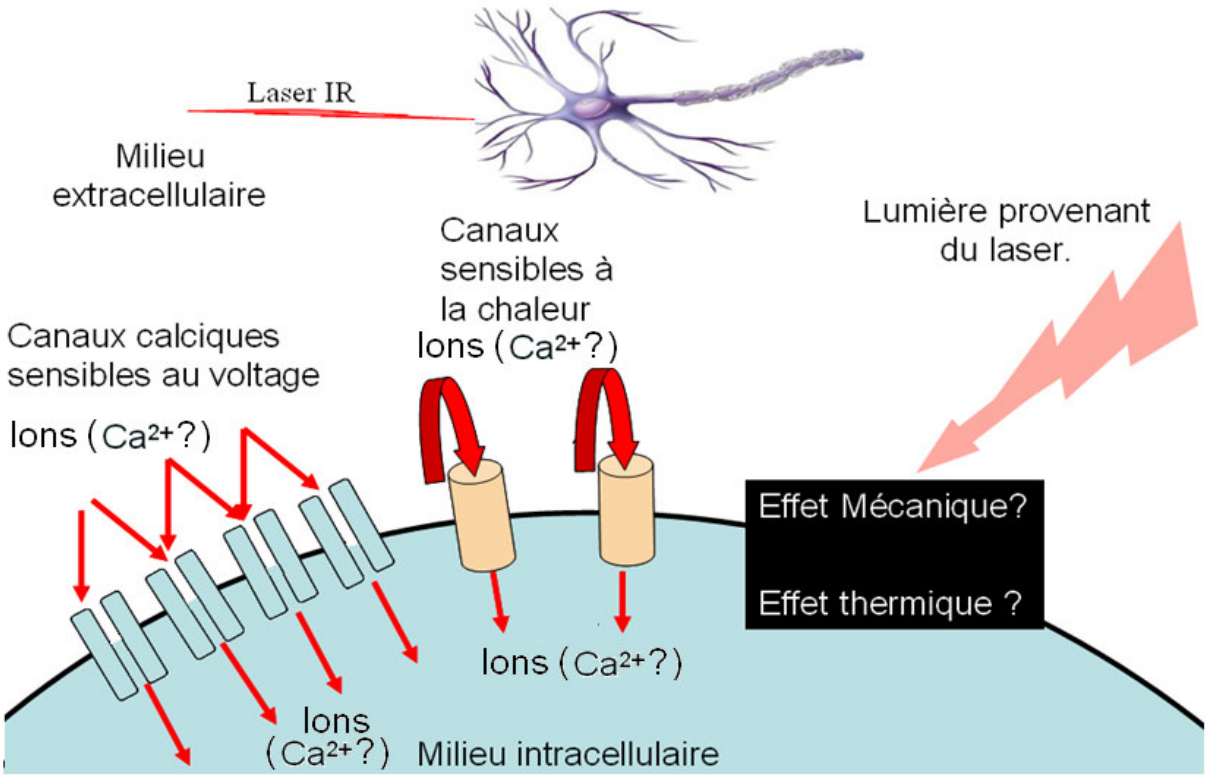


Figure 6 : Schéma simplifié représentatif des hypothèses d'interactions du laser avec le neurone.

4.3.1. Tests pharmacologiques.

Les tests pharmacologiques ont été utilisés dans un premier temps pour confirmer la nature biologique de nos signaux. Dans un deuxième temps, ils doivent permettre d'identifier les canaux et les ions impliqués au cours de la réponse cellulaire.

Ces tests consistent à injecter des drogues ou des toxines spécifiques dans le milieu de la culture cellulaire afin d'inhiber, par exemple, la fonction de certaines protéines canaux. Les différences observées sur les réponses avant et après le test permettent de connaître le niveau d'implication des canaux visés dans la chaine de réaction cellulaire au cours de la stimulation laser.

Le choix des drogues et des protocoles de tests dépasse le cadre de ma thèse. Il est effectué par Mlle Emmanuelle Albert, à l'INM qui traitera les résultats obtenus d'un point de vue de biologique dans sa thèse. Nous présentons cependant dans les paragraphes ci-dessous une sélection de tests déjà réalisés ayant permis de démontrer la nature biologique des signaux enregistrés au cours des tests. Il est important de valider les phénomènes enregistrés par des tests pharmacologiques qui permettent d'écarter les réponses correspondant à un artefact (perturbation électromagnétique externe bruitant le signal). Les tests qui permettent clairement d'identifier les canaux et les ions impliqués lors de la stimulation laser n'ont pas pu être effectués pendant ma thèse, mais sont en-cours de réalisation et seront présentés dans la thèse de S. Albert. Un descriptif de ces tests et des attentes vis-à-vis des résultats sont donnés en fin de partie.

4.3.1.1. Tests pharmacologiques réalisés en imagerie calcique.

Ces tests préliminaires ont pour but de confirmer l'origine des ions calciums intervenant dans l'imagerie calcique.

Des tests ont été effectués sur les mêmes cellules en modifiant la concentration de calcium du milieu physiologique (Figure 7).

Etape 1 :

Test en condition normale avec milieu extérieur contenant du calcium. Stimulation de 30 ms et 110 mW à 1875 nm

Etape 2 :

Test avec milieu extérieur sans calcium. Stimulation de 30 ms et 110 mW à 1875 nm

Etape 3 :

Test en condition normale avec milieu extérieur contenant du calcium. Stimulation de 30 ms et 110 mW à 1875 nm.

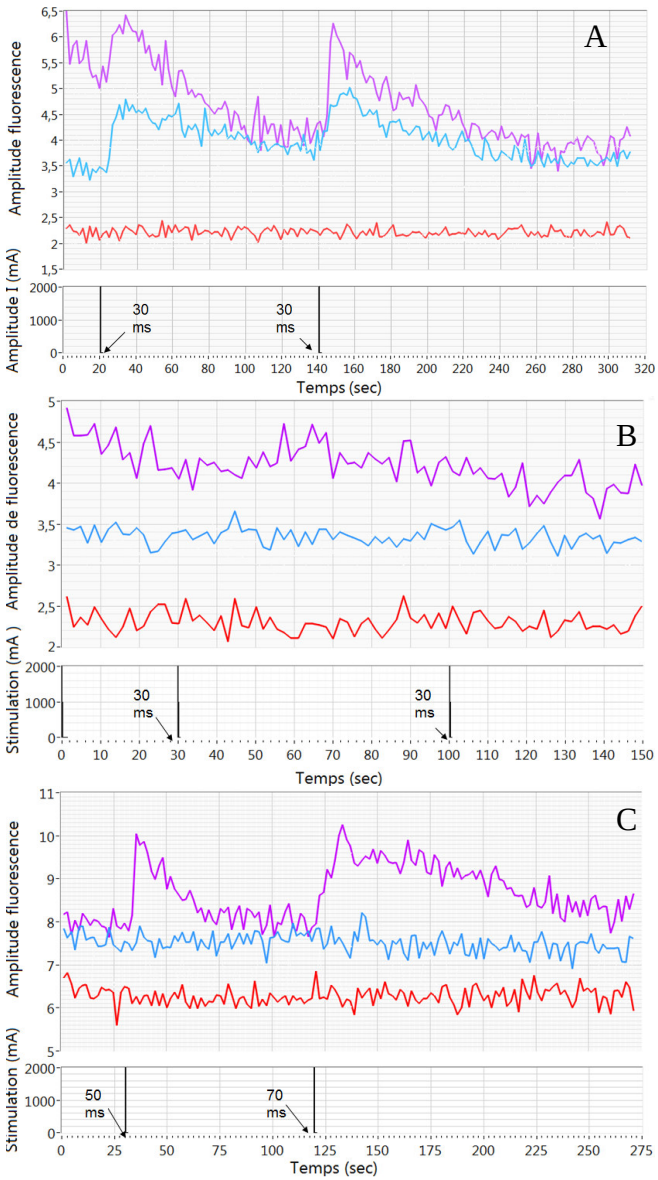


Figure 7 : Tests pharmacologiques opérés sur le milieu physiologique de cellules vestibulaires au cours de stimulation laser (λ = 1875 nm ; P = 110 mW). A : Réponses observées pour des stimulations de 30 ms avec un milieu extérieur contenant du calcium. B : Le milieu initial est remplacé par un milieu sans calcium. Aucune réponse n'est observée pour des stimulations de 30 ms. C : Le milieu sans calcium est remplacé par un milieu avec du calcium et permets d'observer des réponses pour des stimulations de 50 ms et 70 ms.

Au cours de ces tests, aucune réponse n'a été observée en utilisant des milieux physiologiques sans calcium. Toutes les réponses calciques ont été enregistrées avec des milieux extérieurs physiologiques contenant du calcium. Ces tests ont été effectués sur les trois types de modèles utilisés et prouvent que les réponses enregistrées correspondent à une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire.

Les tests pharmacologiques doivent permettre d'identifier les différents canaux permettant le passage des ions calciums. L'injection de drogue telle que le nickel (Ni) ou le

cadmium (Cd) permet de bloquer des canaux calciques sensibles au voltage [77]. L'application de ces drogues au cours de la stimulation optique empêche l'apparition de réponses cellulaires (Figure 8).

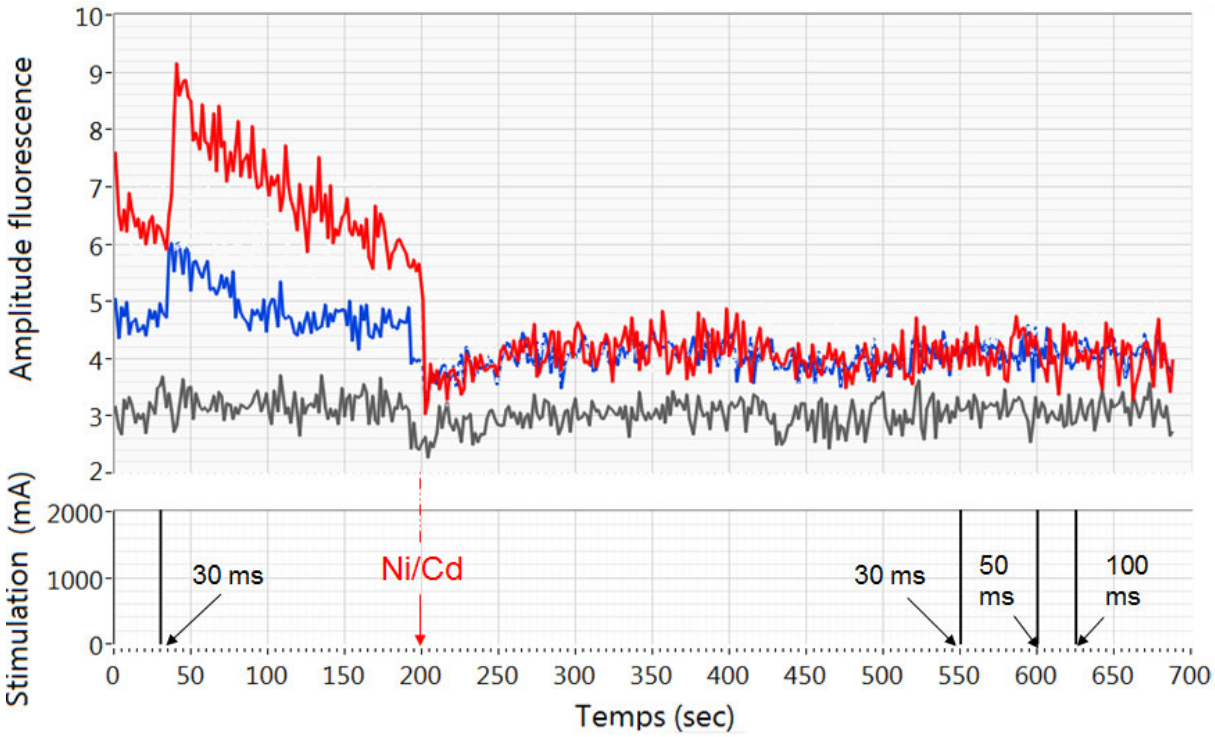


Figure 8 : Test pharmacologique au NI/Cd qui bloque la réponse cellulaire au cours d'une stimulation laser (λ = 1875 nm ; P = 110 mW). Ce test montre l'implication des canaux calciques voltage dépendants.

Ce test permet de valider l'implication des Canaux Calciques Voltage dépendants (CCVD) pour les réponses observées et prouve la nature biologique des signaux enregistrés.

4.3.1.2. Tests pharmacologiques réalisés en électrophysiologie.

L'utilisation de la Tetrodotoxine (TTX), permet d'inhiber les canaux sodiques sensibles au voltage qui sont responsables de la génération des potentiels d'action (Figure 9) [78]. Ce test permet de vérifier que le signal observé est un PA. Après avoir observé des PA déclenchés par stimulation électrique (A) et optique (B), la TTX est appliquée dans le milieu cellulaire. Après un temps d'attente de 5 minutes qui assure une répartition homogène de la toxine dans le milieu, la cellule est excitée optiquement et ne génère plus qu'une dépolarisation sans PA (C). La stimulation électrique confirme l'effet de la TTX par l'absence de PA enregistrée.

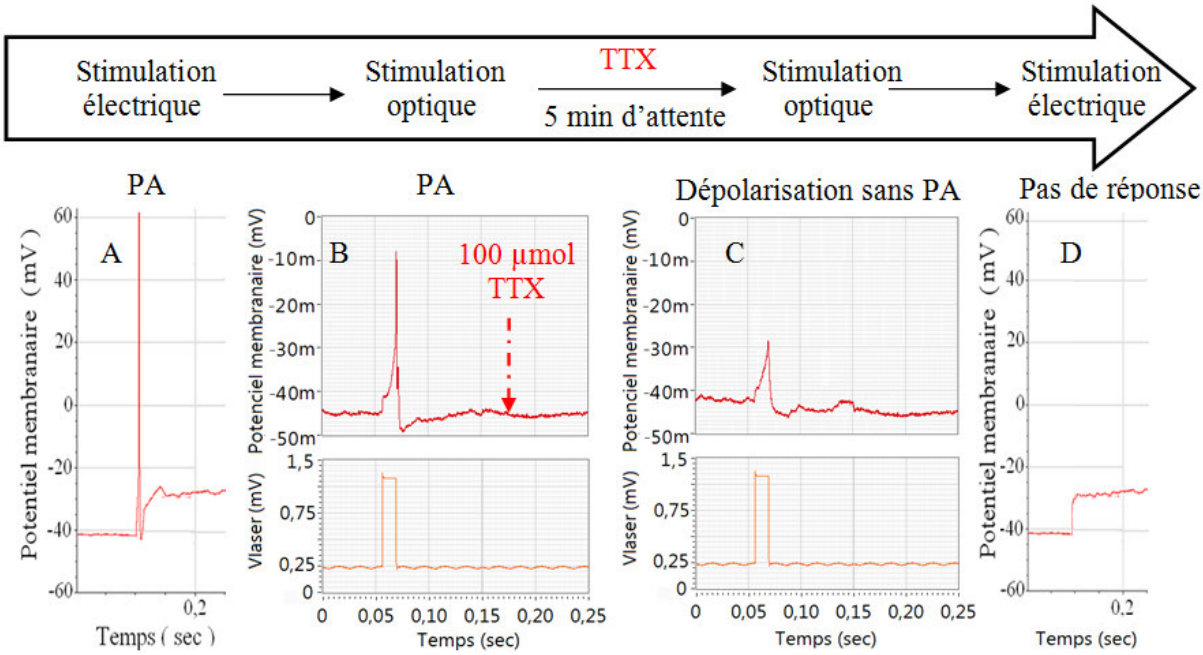


Figure 9 : Test pharmacologique au TTX qui bloque les canaux sodiques voltage dépendant (λ = 1875 nm ; P = 230 mW ; T = 13 ms). Ces tests prouvent que le laser déclenche des potentiels d'action. ***A : Stimulation électrique en début de test qui provoque un PA. B : la stimulation optique déclenche un PA, application de 100 µMl de TTX et attente de 5 minutes. C : Stimulation optique provoque une dépolarisation, mais pas de PA. D : Stimulation électrique en fin de test montre la disparition des PA.***

Ce résultat montre que des canaux bloqués par la TTX sont mis en jeu lors de la génération de PA par laser. En revanche, la stimulation optique entraine l'ouverture de canaux non bloqués par la TTX (visible par la dépolarisation) contrairement à la stimulation électrique.

4.3.1.3. Recherche du ou des mécanismes biologiques impliqués.

L'identification du ou des mécanismes biologiques qui sont à l'origine de la réaction cellulaire permettra de connaître le mécanisme physique déclencheur. Dans ce but, des tests pharmacologiques sont en cours de réalisation. Afin d'explorer l'hypothèse d'un effet thermique, les prochains tests vont cibler une famille de canaux présentant une sensibilité à la variation de la pression et/ou de la température. L'idée que ces canaux jouent un rôle lors d'une stimulation laser a déjà été avancée au cours d'une étude de McCaughey sans pourtant être prouvée [79]. Dans cette étude, il est question de canaux Transient Receptor Potential (TRP) de type c1 et c2 qui réagissent chacun à des seuils de températures de 46 °C pour l'un et 56 °C pour l'autre.

Si de tels types de canaux sont impliqués lors d'une stimulation laser, l'énergie nécessaire pour provoquer une élévation de température suffisante devrait être d'autant plus grande que la température du neurone est basse au départ. Dans ce cas, cette propriété devra être prise en considération dans la détermination des seuils d'énergie de stimulation et expliquerait peut-être en partie l'écart des seuils de stimulation que l'on peut observer entre les tests in vitro et les tests in vivo de la littérature. A titre informatif, la totalité de nos tests ont été réalisés à température ambiante (autour de 20 °C).

Les tests réalisés sur ces canaux « Transient Receptor Potential » (TRP) permettront de préciser si un effet thermique ou mécanique est responsable de la réaction cellulaire.

En complément de ces résultats pharmaceutiques, il est important de connaître l'augmentation de la température générée par le laser. La partie suivante détaille les paramètres physiques qui rentrent en compte lors de l'absorption du faisceau laser et les outils qui permettent de la calculer.

4.3.2. Etude physique de l'effet thermique.

Nous allons dans un premier temps faire quelques rappels sur la génération et la dissipation thermique ayant lieu lors de l'absorption d'un faisceau laser dans un milieu absorbant. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus par simulation numérique grâce au logiciel FlexPDE.

4.3.2.1. Quantification de l'élévation de la température.

Considérons dans un premier temps un volume d'eau soumis à un rayonnement lumineux. L'élévation de température dans un volume élémentaire dv pendant un temps dt est reliée à la variation d'énergie dans ce volume durant dt :

$$dE = \rho . C_p . dT \qquad (1)$$

Avec :

- dE= augmentation de densité d'énergie par unité de masse (J/m^3),
- dT = augmentation de la température (K),
- ρ = masse volumique =1000 kgm^{-3},
- Pour l'eau : la capacité thermique Cp = 4350 $Jkg^{-1}\ K^{-1}$.

La variation dE est égale à la différence entre l'énergie déposée et l'énergie évacuée pendant dt. Dans le cas de la stimulation laser, l'énergie déposée Q correspond à l'énergie absorbée par le volume élémentaire pendant dt. Elle est reliée à la densité d'énergie lumineuse ψ par unité de surface par la relation :

$$Q = \mu_a \cdot \psi \quad (2)$$

avec $\mu_a(x)$ le coefficient d'absorption (m^{-1}) de l'eau.

Une propriété importante à prendre en considération est la conductivité thermique du milieu ciblé. La conséquence de cette conductivité est que la chaleur déposée ne reste pas indéfiniment confinée au même endroit, mais se propage hors des limites de la zone irradiée**.** Il est constaté empiriquement que le flux de chaleur q = (q_x, q_y, q_z) est proportionnel au gradient de la température, donné par le vecteur $\nabla T = \left(\frac{\partial T}{\partial x}, \frac{\partial T}{\partial y}, \frac{\partial x}{\partial z} \right)$.

Le flux de chaleur q est lié au gradient de température par la relation :

$$q = -k.\nabla T \qquad (3)$$

Où la constante k est la conductivité thermique, et vaut 0,63 $W.m^{-1}.K^{-1}$ pour l'eau.

Finalement, la variation d'énergie par unité de volume pendant un temps dt est donc donnée par la relation :

$$dE = -\nabla.q + Q \quad (4)$$

Où ∇ représente la divergence du flux de chaleur q et Q la source de chaleur.

Les équations 1 et 4 nous donnent finalement :

$$\frac{\partial T}{\partial t} - D.\nabla^2.T = \frac{Q}{\rho.C_p} \qquad (5)$$

Avec la conductivité en température $D = \frac{k}{\rho.C_p} \approx 114\ 10{-}9\ m^2.s^{-1}$.

4.3.2.2. Simulation de l'augmentation de la température.

Afin d'évaluer l'augmentation de température provoquée par la stimulation laser, nous nous sommes servis d'un logiciel de modélisation de calcul numérique à éléments finis : FlexPDE. Ce logiciel commercial permet d'obtenir des solutions numériques aux équations aux dérivés partielles en deux ou trois dimensions, pour résoudre des problèmes en régime stationnaire ou dynamique dans des domaines tels que l'électromagnétisme, la mécanique des fluides ou l'étude des contraintes mécaniques.

Dans notre cas, cet outil nous permet d'étudier le flux thermique induit par le laser dans l'eau. La résolution numérique du phénomène de diffusion permet l'accès aux valeurs de température dans l'espace au cours du temps. FlexPDE nécessite la définition d'un ensemble de conditions (initiales et aux limites) et de paramètres selon des critères géométriques et physiques.

Les paramètres physiques qui sont pris en considération sont les suivants :

- ρ = masse volumique = 1000 kgm^{-3}.
- Conductivité thermique de l'eau k = 0,63 $W.m^{-1}.K^{-1}$
- Capacité thermique de l'eau Cp = 4350 $J.kg^{-1}.K^{-1}$,
- μa (x) : coefficient d'absorption (m^{-1}) de l'eau suivant la longueur d'onde
- Longueur d'onde (nm)

Nous avons choisi une résolution du problème en coordonnées cylindriques du fait de la forme du faisceau laser (Figure 10).

Les paramètres géométriques à fixer correspondent :

- A la délimitation de la zone de la source primaire de chaleur (dimension géométrique de l'extrémité de la fibre). La fibre (non représentée sur la figure) est située sur l'axe z et a pour extrémité le plan x = 0. (1)
- A l'angle solide du rayonnement émis dépendant de la valeur de l'ouverture numérique de la fibre qui est de 0,22 dans l'air et de 0,27 dans l'eau. (2)
- A la délimitation du volume d'eau entourant la fibre. (3)

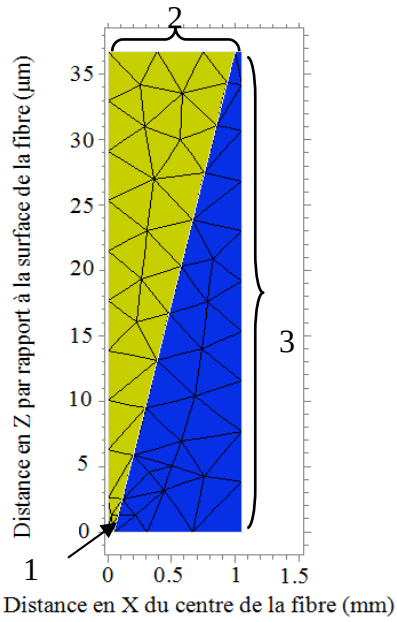


Figure 10 : Détail des zones géométriques du modèle cylindrique (Vue de coupe).

Ce modèle permet de mesurer l'augmentation de la température en tout point lors de la stimulation laser. Nous avons donc mesuré l'évolution de température à des coordonnées correspondant au placement des cellules par rapport au centre de la fibre. Pour les tests électrophysiologiques, la cellule est décalée de 50 µm par rapport au centre de la fibre selon x et 160 µm selon z. Pour les tests d'imagerie, la cellule est centrée et placée à 200 µm selon z de la surface de la fibre (Figure 11).

Les simulations comportent une imprécision sur les valeurs atteintes au cours de la stimulation. En effet, le modèle proposé ne prend pas en compte la distribution gaussienne du faisceau en sortie de fibre. En condition réelle, une cellule placée en périphérie du spot laser reçoit une puissance inférieure à celle placée au centre. Pour la simulation, la puissance est distribuée uniformément sur la surface du spot. Par conséquent, les valeurs de température simulées seront légèrement inférieures à la réalité pour les tests concernant l'imagerie et légèrement supérieures pour les tests d'électrophysiologie.

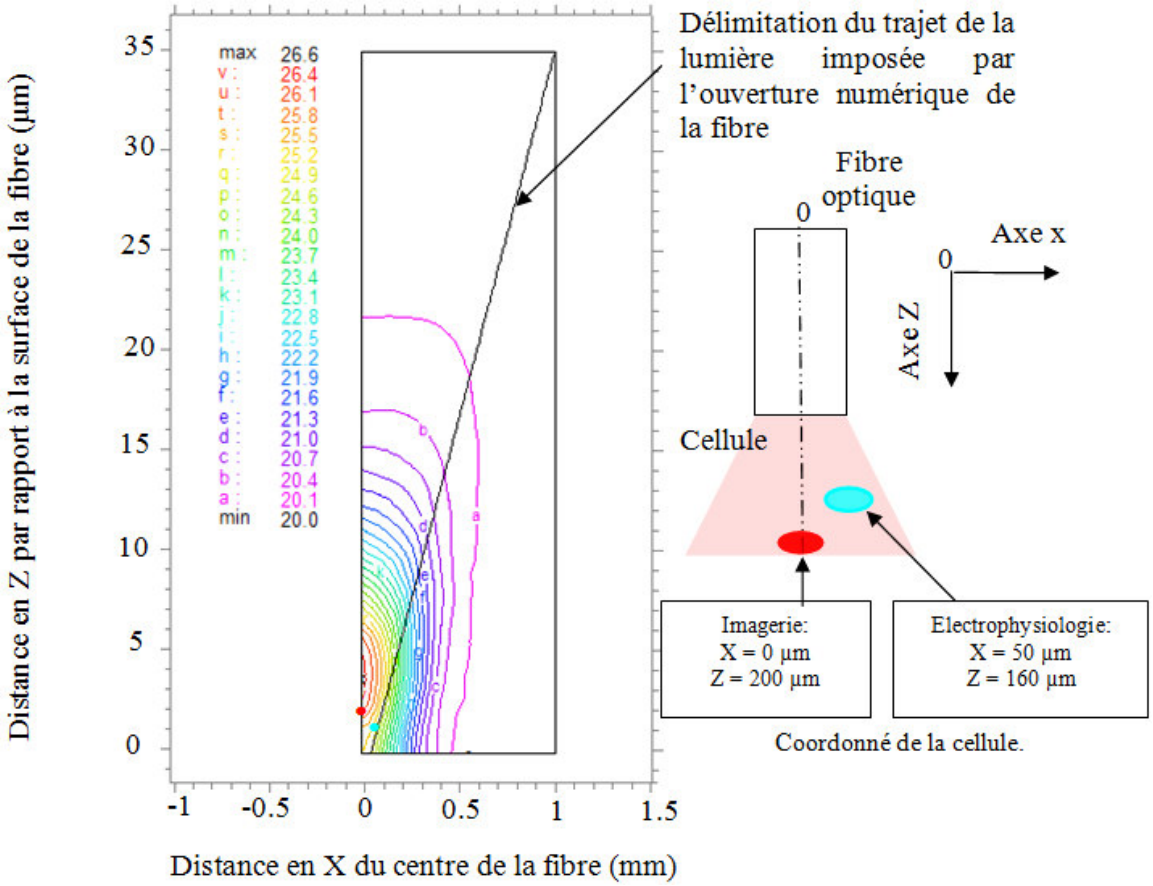


Figure 11 : Résultat de simulation de l'élévation en température produite par la lumière du laser quand il traverse un volume d'eau. Ici les valeurs indiquées correspondent à la température atteinte au bout de 100 ms pour une puissance optique de 230 mW en sortie de fibre et une longueur d'onde de 1875 nm.

Ce modèle permet de visualiser et de comparer la gamme de température atteinte lors d'une stimulation en imposant la puissance et le temps d'exposition. Ces tests ont été réalisés avec les paramètres correspondant aux seuils de stimulation mesurés au cours des tests électrophysiologiques et d'imagerie à une position de cellule fixe.

Nous avons vérifié notre modèle en comparant les augmentations de température données dans la littérature avec ceux calculés par notre modèle en prenant en compte les caractéristiques de chacune des expériences dans la limite des données fournies par les auteurs (tableau 1).

Auteurs	λ (µm)	Coeff abs (cm^{-1})	Diamètre Fibre (µm)	Distance (µm)	Seuil (J/cm^2)	T_{stim} (s)	Élévation Température (°C)	Résultat Simulations (°C)
J.Wells [63]	2.12	26.5	600	750	0.4 à 0.8	350.10^{-6}	8.95	4
A.D.Izzo [59]	1,94	136	200	coller	0,005	$100,10^{-3}$	0,15	0,12
R. G. Mc.Caughey [79]	1,495	22,8	28	2000	3,7 ± 28,	$2\ 10^{-3}$	13	15

Tableau 1 : Comparaison des valeurs de température données par la littérature et nos résultats de simulation.

Nous pouvons vérifier que nos simulations retrouvent l'ordre de grandeur de l'augmentation de température d'exemples de configurations de la littérature.

a. Résultats de simulation pour les tests d'imagerie calcique.

Pour cette étude de l'aspect thermique des résultats obtenus en imagerie calcique, nous avons sélectionné les résultats obtenus sur les cellules vestibulaires qui offrent la possibilité d'étudier les trois longueurs d'onde (Figure 12). Pour chacune d'elle, les résultats de la simulation sont accompagnés d'une courbe récapitulative des résultats mise sous la forme des puissances optiques du laser en fonction du temps de stimulation.

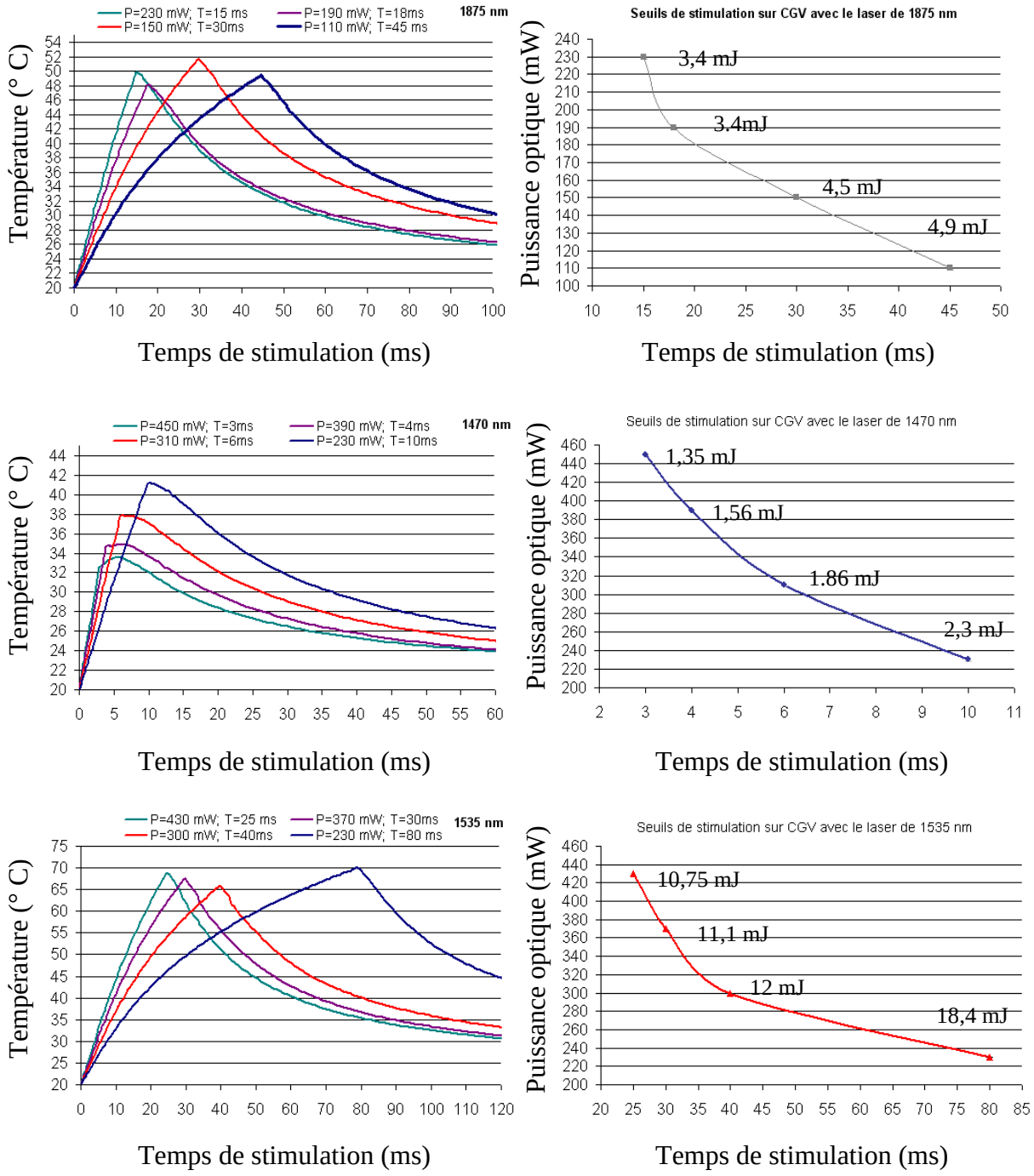


Figure 12 : Résultats de la simulation de l'élévation de la température absolue correspondant aux résultats d'imagerie sur CGC pour les trois longueurs d'onde en fonction du temps de stimulation (courbe de gauche). Les courbes de droite sont des courbes récapitulatives des résultats mises sous la forme des puissances optiques du laser en fonction du temps de stimulation.

Les résultats des simulations obtenus montrent que les valeurs de température atteintes au cours de la stimulation restent stables pour deux longueurs d'onde (1535 et 1875 nm) et montrent une plus grande variation pour 1470nm. Ainsi, pour chaque longueur d'onde, les résultats sont les suivants :

- pour le laser de 1535 nm : températures comprises entre 65 et 70 °C
- pour le laser de 1875 nm : températures comprises entre 50 et 54 °C
- pour le laser de 1470 nm : températures comprises entre 32 et 41 °C

Les lasers de 1875 nm et de 1535 nm montrent une faible variation de leurs valeurs de température maximum. Alors que les seuils d'énergie augmentent quand les temps de stimulation augmentent, la température atteinte dans ces deux cas reste la même. Cela peut s'expliquer en faisant intervenir la notion de diffusion thermique. Lorsque la durée de stimulation est grande, l'énergie contenue dans la zone stimulée a le temps de diffuser, et il faut donc augmenter la quantité d'énergie déposée pour atteindre la température de seuil.
La diffusion thermique est caractérisée par le paramètre appelé temps de relaxation thermique (τ_{th}), qui est définie par le temps que met la température pour redescendre à 37 % de sa valeur maximum (Figure 13). Les mesures réalisées donnent un temps de relaxation thermique se situant autour de 35 ms pour les 3 lasers.

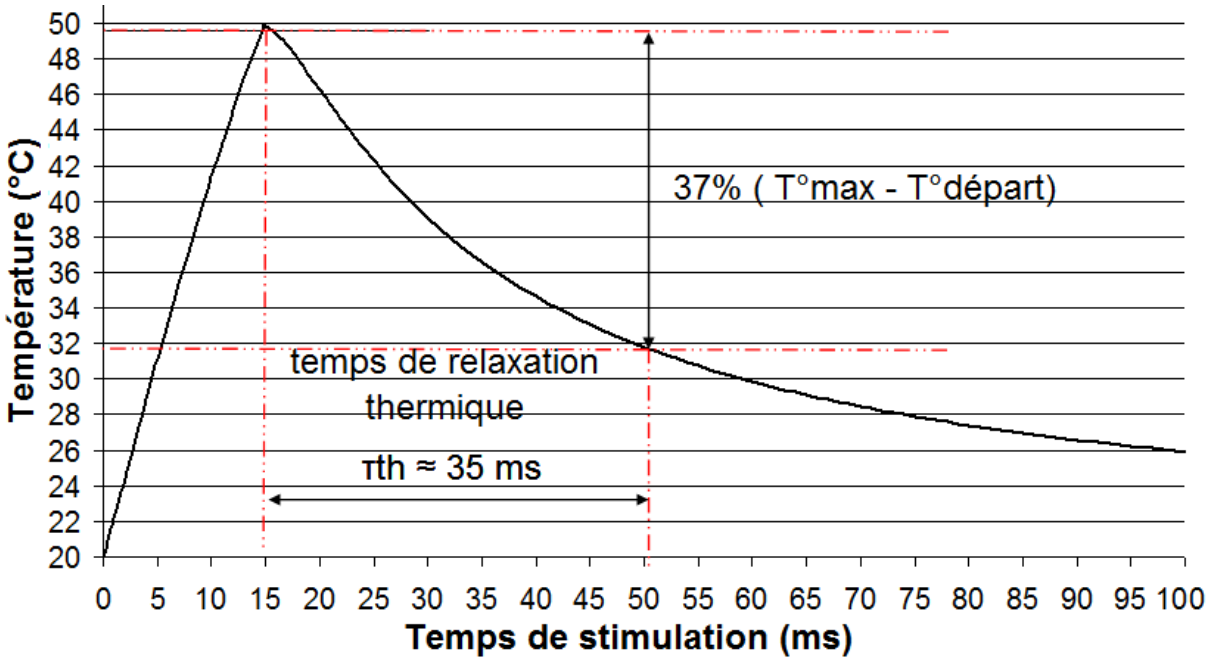


Figure 13 : Mesure du temps de relaxation thermique pour le cas du laser à 1875 nm (Ici pour P = 230 mW et T = 15 ms).

Dans le chapitre 3, nous avons vu que les lasers de 1470 et 1875 nm possèdent des coefficients d'absorption équivalents (autour de 30 cm^{-1}). De fait, il est intéressant de disposer les résultats des courbes A et B sur une même figure. L'observation commune de ces deux

séries de résultats permet d'étudier l'effet de la diffusion sur une gamme de temps allant de 3 ms à 45 ms (Figure 14). Sous cette forme il apparaît que pour une puissance et un temps de stimulation équivalent, soit à P = 230 mW et T = 15 ms pour le laser de 1875 nm (1) et P = 230 mW et T = 12 ms pour le laser de 1470 (2), les courbes de température suivent la même évolution pendant la durée de stimulation.

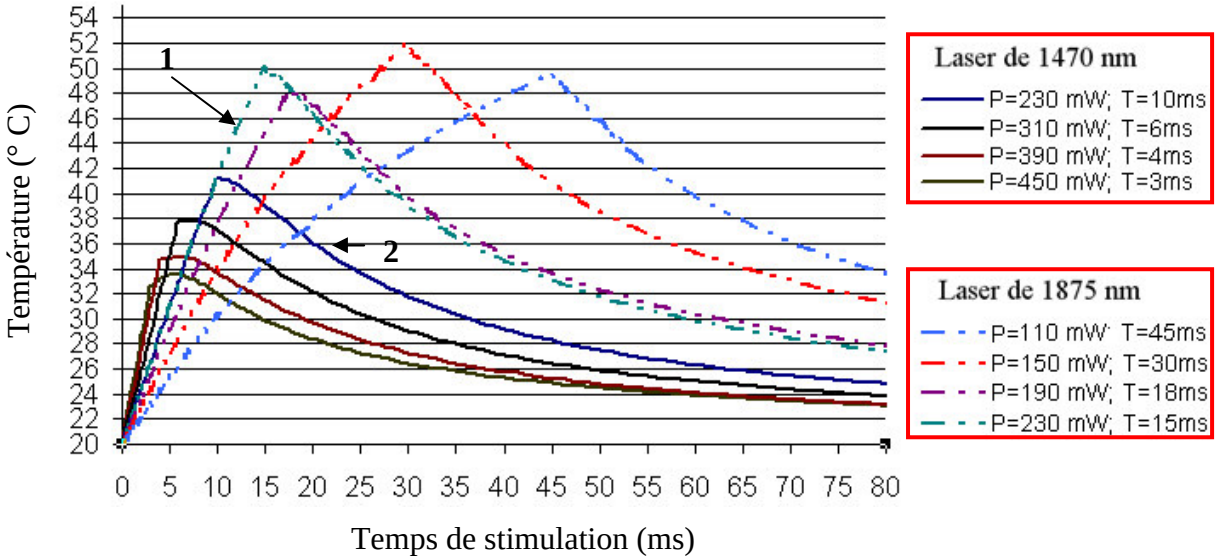


Figure 14 : Courbe de l'élévation de la température absolue lors de la stimulation laser pour deux longueurs d'onde possédant le même coefficient d'absorption.
1 : λ = 1875 nm ; P = 230 mW ; T = 15 ms, 2 : λ = 1450 nm ; P = 230 mW ; T = 10 s.

Il semble que les temps de stimulation employés avec le laser de 1470 nm soient suffisamment brefs pour limiter la propagation de la chaleur à l'extérieur de la zone visée. En revanche, les puissances des lasers de 1535 et de 1875 nm ne permettent pas la stimulation de neurone avec des temps inférieurs au temps de relaxation thermique.

On constate que les cellules semblent présenter deux comportements différents :

- les courbes de variation de température obtenues à 1875 nm et 1535 nm indiqueraient une sensibilité de la cellule à une valeur absolue pour le seuil de température.
- Les courbes obtenues avec le laser à 1470 nm pourraient indiquer au contraire une sensibilité de la cellule à un gradient de température.

Devant ces résultats, ces hypothèses devront être encore étudiées, en particulier au cours des tests pharmacologiques en prenant en compte le temps de stimulation.

Enfin, les valeurs des températures de seuils à 1535 nm comprises entre 64 et 70 °C apparaissent excessives. Ces valeurs sont clairement surévaluées par notre modèle puisque nous n'avons pas pris en compte notamment la diminution linéaire du coefficient d'absorption de l'eau en fonction de la température [80]. Le coefficient d'absorption décroît en effet linéairement d'un facteur 2/3 lors d'une variation de température de 20 °C à 100 °C. En première approximation, le maximum de température de seuil devient ainsi 55 °C, valeur proche de la valeur déterminée pour le laser à 1875 nm, pour un coefficient d'absorption de 10 cm^{-1} (à la place de 13 cm^{-1}).

b. Résultats de simulation des tests d'électrophysiologie.

Nous présentons ci-dessous les variations de température accompagnant l'apparition de PA sur les deux types de cultures cellulaires. Les paramètres de stimulation utilisés pour les simulations correspondent à ceux des seuils d'énergie obtenus en électrophysiologie. Les résultats concernent les trois longueurs d'onde utilisées lors des tests expérimentaux en patch clamp (Figure 15).

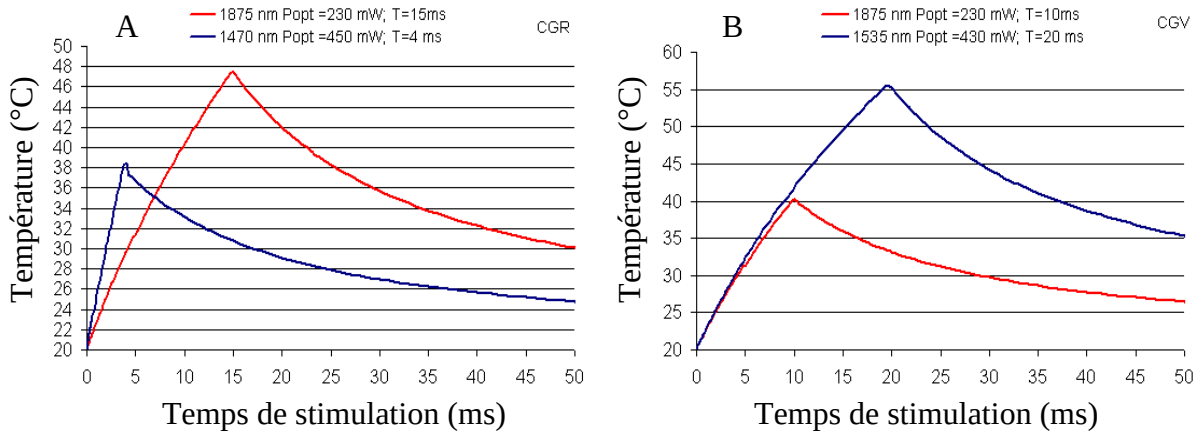


Figure 15 : Résultats de la simulation de l'élévation de la température absolue correspondant aux tests d'électrophysiologie ayant provoqués un PA en fonction du temps de stimulation.
A : Résultats obtenus sur CGR avec un λ = 1875 nm ; P = 230 mW ; T = 15 ms et λ = 1470 nm ; P = 450 mW ; T = 4 ms. B : Résultats obtenus sur CGR avec un λ = 1875 nm ; P = 230 mW ; T = 10 ms et λ = 1535 nm ; P = 430 mW ; T = 20 ms.

Malgré le faible nombre de points de mesure, nous retrouvons les mêmes gammes de températures et les mêmes tendances que celles observées pour les résultats d'imagerie de fluorescence pour les températures de seuils :

- Une plus faible augmentation de température pour les faibles temps de stimulation (laser 1470 nm) avec un maximum à 38 °C obtenu en 5 ms,
- Une plus forte augmentation de température pour le laser à 1535 nm, avec un maximum à 55 °C obtenu en 20 ms,
- Les deux résultats obtenus pour le laser à 1875 nm confirment également ces tendances : maximum de température à 47 °C obtenu en 15 ms et maximum à 40 °C obtenu en 10 ms qui peuvent s'expliquer par la relaxation thermique.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les différents modes d'interaction entre la lumière et les tissus biologiques.
L'étude de la littérature a montré que la stimulation neuronale par laser infra rouge dans nos gammes de puissance semble être liée à l'effet thermique, c'est-à-dire à une augmentation locale de température suite à l'absorption d'énergie par le milieu.

Nous avons voulu confirmer cette hypothèse en cherchant à déterminer les types de canaux ioniques transmembranaires responsables des réponses biologiques ainsi qu'une estimation de l'augmentation de température générée par nos pulses lasers.

Les résultats préliminaires des tests phamacologiques confirment la nature biologique des stimulations lasers et ils montrent l'implication de canaux calciques voltage dépendants ainsi que l'implication des canaux sodiques sensibles au voltage. Des tests complémentaires doivent être menés pour confirmer l'implication directe de canaux dépendants à la température.

Le modèle numérique que nous avons développé pour quantifier l'élévation de température engendrée par le pulse laser montre une augmentation de température de 20 °C à 35-55 °C suivant les lasers. Ces valeurs de températures sont clairement en dessous du seuil d'endommagement des cellules, même si une étude plus complète doit être menée afin de vérifier l'innocuité de cette gamme de température sur le long terme. L'analyse des courbes de variation de température fait apparaître deux comportements distincts : pour les temps de stimulation les plus longs, les cellules réagissent à un seuil absolu de température, alors que pour les temps les plus courts, les cellules réagissent à un gradient de température. L'achat d'une source de courant plus puissante pourra permettre d'utiliser les lasers à pleine puissance et d'atteindre des temps de stimulation inférieurs à 1 ms (de l'ordre de la dizaine de µs) et confirmer ces premières analyses.

Conclusion générale

Le premier objectif de ma thèse était de démontrer qu'un neurone, notamment de rétine, pouvait être excité par une lumière Infra Rouge (IR).

Cet objectif est atteint. En effet, les résultats obtenus montrent qu'une stimulation laser IR entraine une réponse du neurone ciblé.

Les bancs de stimulation et de mesures sont opérationnels et permettent la réalisation de tests en patch clamp et en imagerie calcique. Les tests effectués par ces deux techniques nous ont permis d'enregistrer des réponses calciques et des potentiels d'action avec des cellules ganglionnaires de la rétine mais également avec des cellules ganglionnaires du vestibule. Des réponses de cellules gliales ont aussi été observées en imagerie calcique.

Ces résultats sont très importants pour l'avenir du projet LASDOP car ils montrent la faisabilité d'une stimulation optique. Ils permettent au projet de continuer en gardant l'objectif initial, soit : créer une prothèse visuelle basée sur la stimulation laser.

L'interprétation des résultats nous apprend que les seuils d'énergie de stimulation dépendent de la valeur du coefficient d'absorption de l'eau, qui lui-même varie suivant la longueur d'onde utilisée. De plus, ces seuils d'énergie de stimulation s'amenuisent au fur et à mesure de la diminution des temps de stimulation. Cette tendance est validée dans la gamme des puissances dont nous disposions pour nos tests.

On peut noter aussi la très grande résolution spatiale obtenue. Ce point est tout à fait intéressant dans le cadre du développement d'un stimulateur rétinien implanté. En revanche, la forte absorption de l'eau à ces longueurs d'onde implique de positionner la fibre à quelques centaines de microns des neurones.

La dernière partie de ma thèse a été consacrée à l'étude des mécanismes physiques et biologiques apparaissant au cours de l'interaction du laser avec le neurone.

Nous avons tout d'abord cherché à quantifier l'énergie reçue par la cellule, en fonction du type de fibre utilisé et de son positionnement puis à évaluer l'élévation locale de la température induite par la lumière. Ces aspects sont traités par des programmes de simulation et de calcul. Les résultats de ces études montrent que l'énergie reçue par un neurone au cours de la stimulation provoque une élévation de la température locale pouvant atteindre une soixantaine de degrés. Ces résultats confortent les présomptions impliquant un effet thermique dans la réponse à une stimulation laser.

Les bancs expérimentaux sont les outils indispensables pour identifier le mécanisme biologique responsable de la réponse cellulaire, grâce à des tests pharmacologiques. Les

premiers résultats ont permis de prouver le caractère biologique des réponses obtenues en montrant l'action des canaux calciques sensibles à la tension au cours des tests d'imagerie, et en contrôlant l'apparition des potentiels d'action par le blocage des canaux sodiques sensibles à la tension au cours des tests en patch clamp.

Les tests pharmacologiques en cours (thèse Sandrine Albert) sont consacrés à la détection de la famille de canaux ioniques responsables de la réaction de la cellule à une stimulation optique. Une fois connue, l'identité de ces canaux permettra d'établir la responsabilité du ou des mécanismes physiques résultant de l'interaction de la lumière et du neurone.

En parallèle de l'étude pharmacologique, l'étude d'un probable effet thermique continue à travers un banc de stimulation thermique réalisé durant ma thèse. Ce banc, déjà opérationnel, permet d'envoyer des impulsions de température par le biais d'un composant thermique de type PT100. Le but de ce banc est de pouvoir provoquer des variations de température de la zone où sont localisées les cellules. Les temps de stimulation et l'augmentation de température seront fixés de manière à correspondre aux valeurs trouvées avec le modèle thermique réalisé pendant la thèse. Cette expérience devrait permettre d'établir une notion de seuil de stimulation thermique lié au seuil d'énergie de stimulation déterminé au cours de la thèse.

Afin d'étudier l'aspect thermique dans le transfert de l'information ou au cours d'une stimulation externe à la cellule, un dossier ANR a été déposé en début d'année 2010. Ce projet pluridisciplinaire rassemble une équipe de l'IES, de l'INM et du LIMMS (Université de Tokyo-CNRS). L'objectif est de mesurer les variations de température au niveau du neurone grâce à un système à base de microcapteurs. Le système devrait rendre possible la mesure des variations de températures en tout point de l'axone du neurone.

Des améliorations et des modifications vont être apportées au banc de stimulation.

L'achat d'une source de courant plus puissante va permettre d'utiliser nos lasers à pleine puissance et d'atteindre des temps de stimulation de l'ordre de la dizaine de microseconde. Des temps de stimulation aussi courts devront permettre de vérifier s'il est possible d'atteindre une gamme de temps pour laquelle le seuil d'énergie minimum reste stable. Dans ces conditions, le phénomène de diffusion thermique devient négligeable, ce qui pourrait améliorer la résolution spatiale de la stimulation.

Les résultats présentés dans le chapitre 3 ont montré l'importance du placement de la fibre pour déterminer l'énergie réellement reçue par la cellule. Des axes motorisés ont été achetés et vont être installés afin d'uniformiser au maximum les conditions de tests. Ce système diminuera les risques liés à la manipulation de la fibre, permettra un gain de temps lors de la mise en place des tests et augmentera la répétabilité des mesures.

Le banc de test étant évolutif, l'équipe a fait l'acquisition d'un laser de longueur d'onde 920 nm pour tester son efficacité sur les neurones. Cette longueur d'onde a été choisie car elle est la seule dans l'IR à être plus absorbée par les lipides que par l'eau. Les lipides étant le constituant principal de la membrane cellulaire, il semble intéressant d'observer si les cellules peuvent réagir à cette longueur d'onde et dans ce cas, d'observer les réponses et les seuils de stimulation obtenus. Cela pourrait permettre de stimuler les neurones en positionnant la fibre optique beaucoup plus loin qu'actuellement, ce qui serait intéressant dans le cadre du développement d'un stimulateur rétinien implanté.

Les tests in vitro ont permis d'optimiser les paramètres de stimulation permettant d'obtenir des réponses cellulaires. Cette expérience acquise va nous permettre de passer aux essais sur des animaux vivants. Un travail important d'adaptation a déjà été réalisé sur le banc de mesure des Potentiels EVoqués, et permet d'enregistrer simultanément les signaux de stimulation et de mesures. Le travail qu'il reste à faire concerne le placement de la fibre dans un œil de souris de très petite dimension qui offre une visibilité très réduite.

Enfin, ces travaux ouvrent des perspectives dans des domaines légèrement différents. La partie stimulation laser de neurone du chapitre 1 de la thèse décrit une stimulation par une lumière visible de neurone rendu photosensible par thérapie génique. Ce type de stimulation rentre tout à fait dans les perspectives communes de l'INM et de l'équipe STINIM. En effet, les traitements par thérapie génique sont maitrisés par l'équipe de l'INM et notre banc de stimulation peut très rapidement se doter d'un laser visible et être opérationnel.

Annexes

Annexe 1 :

La cellule : description et fonctionnement

Toute cellule de l'organisme possède une enveloppe appelée membrane plasmique. Elle se compose d'une double couche lipidique formée d'une partie hydrophile sur ses deux surfaces et d'une partie hydrophobe en son centre. Cette formation a pour effet d'isoler le milieu interne de la cellule avec son environnement extérieur direct. Ces milieux se composent de molécule d'eau et de différents ions chargés positivement (anions) ou négativement (cations). Le bilan des charges respectif de chaque coté de la membrane montre un nombre de charges négatives plus important dans le milieu intra cellulaire par rapport à l'extérieur. Les charges négatives « libres » tendent naturellement à se lier à une charge positive, mais sont bloquées par la membrane plasmique. Cette attirance entre charges de signe opposé produit un champ de force électrique qui permet de mesurer un potentiel de membrane (mV) correspondant à l'énergie nécessaire à un ion pour traverser cette barrière (Figure 16). Charges positives et négatives se répartissent uniformément de par et d'autre de la surface de la cellule ce qui rend le potentiel transmembranaire constant en tout point de la membrane. Si une modification de potentiel survient en un point de la membrane, ce changement se répercute à l'ensemble.

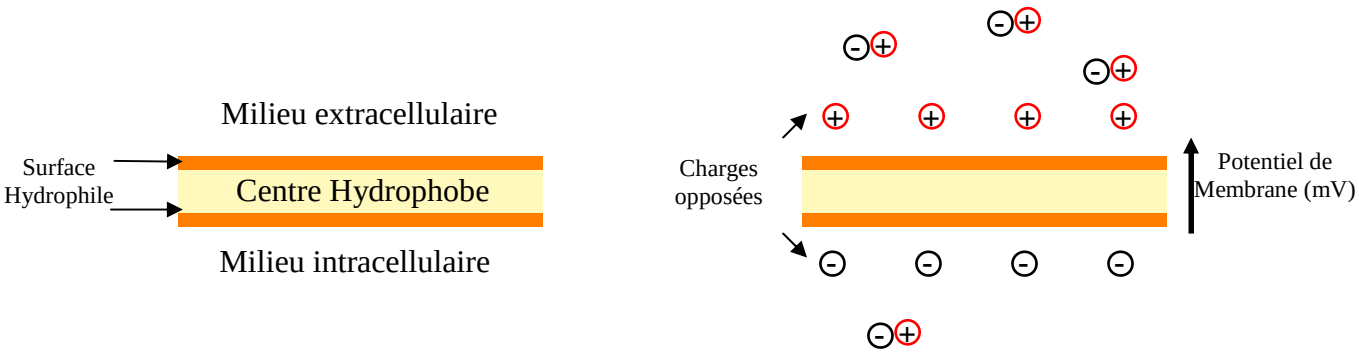


Figure 16 : Structure et répartition des charges de la membrane plasmique

Le rôle d'une cellule est de recevoir un signal sur une de ses extrémités et de la transmettre par une autre. Les mécanismes physiques responsables de ce transfert dépendent entièrement de la sensibilité de la cellule aux changements de potentiel aux bornes de sa membrane plasmique. Chaque cellule qui se trouve dans un état non excité affiche un potentiel de

membrane constant (potentiel de repos pour les neurones ou d'obscurité pour les photorécepteurs). Cet état de stabilité apparent est rendu possible par un échange constant et contrôlé d'ions entre les milieux intra et extracellulaire. Ces échanges se déroulent au niveau de molécules protéiques spécialisées qui traversent la membrane et qui jouent le rôle de portes d'entrée ou de sortie de la cellule (Figure 17). Il existe trois types de molécule, les canaux, les échangeurs et les pompes qui laissent rentrer ou sortir spécifiquement trois ions différents : le potassium (K+), le sodium (Na+) et le calcium (Ca2+).

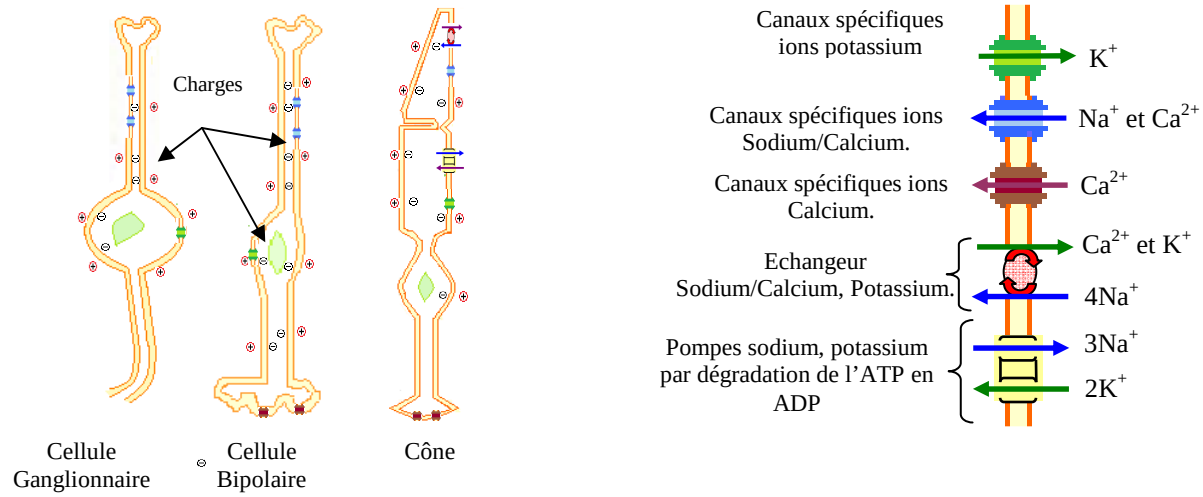


Figure 17 : Classification et emplacement des molécules protéiques spécialisées des cellules de la rétine.

Les canaux ioniques sont les principaux convoyeurs d'ions à travers la membrane. On les reconnaît par le type d'ion qu'ils laissent passer et par leur mode d'activation. Ainsi, la où certains laissent passer les ions calcium, un autre laisse passer les ions potassium ou sodium. Nous pouvons avoir des protéines qui s'activent lorsqu'une molécule spécifique se lie au canal ou quand une variation de potentiel apparaît. Chaque type de canaux se retrouve dans chaque cellule composant la rétine et joue un rôle dans le transfert de l'information. Les canaux ioniques sensibles à une molécule joue un rôle prépondérant dans la création d'un potentiel de membrane dans les photodétecteurs par des canaux spécifiques ions sodium/calcium sensible au GMPc (guanosine monophosphate cyclique), et les cellules bipolaires par les récepteurs postsynaptiques de type canaux sodium/calcium qui s'ouvre ou se ferme au contact du neurotransmetteur. Les canaux ioniques sensibles au voltage sont adaptés pour détecter la moindre variation du potentiel de membrane. C'est par eux que la cellule peut envoyer un message nerveux à une autre cellule. En effet, ils sont à l'origine de la

génération des potentiels d'action par les canaux spécifiques ions sodium/calcium et ions potassium, et de la libération du neurotransmetteur au niveau de la fente synaptique par les canaux spécifiques ions calcium. Un canal ionique spécifique au potassium émet continuellement des ions vers le milieu extracellulaire que la cellule soit stimulée ou non.

Suivant leur concentration dans le milieu intra et extracellulaire, un ion aura moins de difficulté à pénétrer dans la cellule que d'en sortir ou inversement (exemple : 14 ions sodium à l'intérieur pour 140 à l'extérieur). La fonction des pompes sodium, potassium est de forcer le passage du potassium vers l'intérieur et du sodium vers l'extérieur en allant à l'encontre de leur gradient osmotique. Ce transfert, de ce fait, demande un surplus d'énergie qui est fournie par une dégradation de l'ATP en ADP.

Le but d'un échangeur est de transférer les ions Ca^{2+} vers l'extérieur de la cellule ou ils sont en plus grand nombre. L'énergie nécessaire à l'opération est obtenue en transférant dans le même temps quatre ions sodium vers l'intérieur et un ion potassium vers l'extérieur.

En bref, ces différents canaux, échangeurs et pompes opèrent une régulation du potentiel membranaire d'équilibre quand la cellule n'est pas stimulée. Pendant une stimulation, elle assure la détection et les réactions appropriées par l'ouverture ou la fermeture de leurs canaux avant de revenir à l'équilibre une fois l'excitation achevée. Cette structure se retrouve dans chaque type de cellule de la rétine, les photorécepteurs, les horizontales, les bipolaires, les amacrines et les ganglionnaires qui nous intéressent tout particulièrement.

a. Composition et répartition ionique de la cellule:

Chaque milieu est constitué du même type d'ions à une concentration différente (Figure 18). Ainsi, la quantité de cations sodium (Na^+) à l'extérieur de la cellule est de 140 mEq pour seulement 5 mEq à l'intérieur. Idem pour la population d'anion calcium (Ca^{++}) qui est de 1 à l'extérieur pour 10^{-4} à l'intérieur.

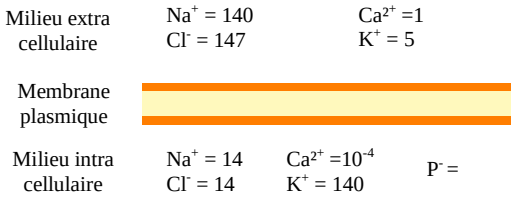


Figure 18 : Composition ionique des milieux intra et extra cellulaire (mEq).

La membrane plasmique est totalement imperméable aux ions organiques P- (acide aminé et protéines) qui sont les principaux anions du milieu intra cellulaire. Elle est rendue perméable à certains ions inorganiques via les protéines canaux spécifiques aux ions inorganiques (Na^+, Ca^+, Cl^-, Ca^{2+}).

Cette distribution ionique obéit à deux grands principes :

- l'électro neutralité : les solutions ioniques des deux milieux doivent être électriquement neutres. Cela signifie qu'elles doivent contenir un nombre égal de cation et d'anions.
- l'équilibre osmotique : le nombre de particules situées de part et d'autre de la membrane doit être le même.

Dans le cas où l'équilibre osmotique (concentration différente) des deux milieux n'est pas respecté, il apparaît un gradient de concentration qui provoque la migration (diffusion), via des protéines canaux spécialisés. Ce flux diffusif va toujours du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré et varie suivant la température. Dans le cas où la membrane est perméable à cette population d'ions, ce phénomène entraine un gradient électrostatique qui s'oppose au flux ionique. Ce champ électrique dépend de la mobilité de l'ion, de sa concentration et de sa valence[1].
Le potentiel membranaire au repos (Vm) correspond à une différence de potentiel négative entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cet état de stabilité apparent est rendu possible par une régulation du potentiel membranaire d'équilibre (passage d'ion contrôlé) quand la cellule n'est pas stimulée pour maintenir un déséquilibre osmotique.
Afin de connaître le potentiel de repos de la cellule en prenant en compte les mouvements des ions dans leur globalité, il faut tout d'abord détailler le phénomène pour un seul type d'ion. L'équation fondamentale permettant de calculer le potentiel d'équilibre pour un seul ion est connue sous le nom de l'équation de Nernst.

b. Calcul du potentiel de repos :

- *Dans le cas d'une seule catégorie d'ion : Potentiel de Nernst*

Pour ce calcul, l'hypothèse de départ est que la membrane cellulaire ne laisse passer qu'une population d'ion.

[1] Valence : elle correspond au nombre de liaisons qu'un atome peut former afin de satisfaire à la règle de l'octet afin de se trouver dans un état stable.

Afin de connaître le potentiel d'équilibre de ou potentiel de diffusion de l'ion désigné, il faut calculer le travail nécessaire pour son déplacement, par diffusion, le long de son gradient de concentration.

Le travail fourni s'écrit :

$$W = R \cdot T \times \ln \frac{[C_e]}{[C_i]} \qquad (1)$$

Avec :

- R la constante de gaz parfaits = 8,314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$
- T la température absolue.
- $[C_i]$ et $[C_e]$ les concentrations intra et extracellulaire.

Ce travail de nature électrostatique tend à s'opposer à la diffusion de l'ion.

Le travail électrostatique est de la forme :

$$W \cdot E_{ion} = Z \cdot F \cdot E_{ion} \qquad (2)$$

Avec :

- Z_{ion} la valence de l'ion.
- F la constante de Faraday qui représente la charge globale d'une mole de charges élémentaires = $9,649.10^{-4}$ $C.mol^{-1}$.
- E_{ion} le potentiel d'équilibre de l'ion (Volt).

Le potentiel de repos d'un ion est atteint et reste constant du fait que le flux ionique est autolimité par le gradient électrostatique qu'il engendre. La valeur de ce potentiel est définie par l'équation de Nernst :

$$E_{ion} = \left(\frac{R \cdot T}{Z \cdot F} \right) \times \ln \frac{[C_e]}{[C_i]} \qquad (3)$$

E_{ion} désigne le potentiel d'équilibre de l'ion ciblé. A ce niveau de potentiel, le gradient électrochimique et le flux d'ions sensible au niveau du canal sont tous les deux nuls.

Lors de l'ouverture d'un canal, il y a création d'un flux d'ions à travers la membrane. Le potentiel de membrane diffère du potentiel d'équilibre de l'ion et entraine la génération d'un courant défini par :

$$I_{ion} = g_{ion} \cdot (V_m - E_{ion})$$

Avec :

- I_{ion} le courant ionique.
- G_{ion} la conductance du canal étudié.
- (V_{m-} E_{ion}) le gradient électrochimique.

Par convention, un courant est sortant et positif lorsque (V_m-V_{eq}) > 0. Il correspond soit à un influx d'ions négatifs, soit à un efflux d'ions positifs. Un courant sortant est hyperpolarisant.
Un courant est considéré entrant et négatif lorsque (V_m-V_{eq}) < 0. Il correspond soit à un influx d'ions positifs, soit à un efflux d'ions négatifs. Un courant entrant est dépolarisant. (Voir Figure 19).

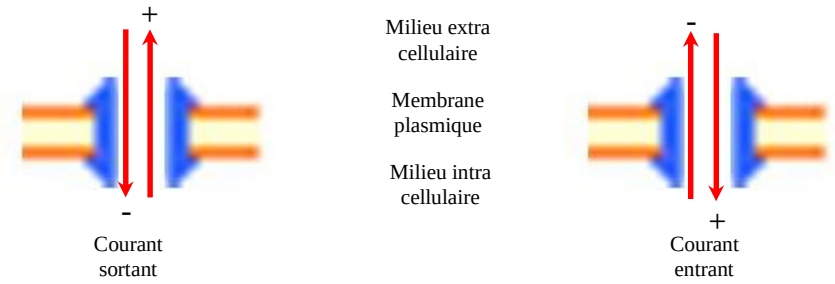


Figure 19 : Convention des courants entrants et sortants d'une membrane cellulaire.

- *Prise en compte de plusieurs ions : formule de Goldman-Hodgins Katz.*

En fonctionnement réel, la membrane est perméable à plusieurs ions. Le calcul du potentiel de repos Vm doit prendre en compte la totalité des flux ioniques. Ce potentiel est donné par l'équation de Goldman-Hodgins Katz qui est une généralisation de l'équation de Nernst étendu au cas de déplacement de plusieurs ions. Cette équation a été établie sur la base d'hypothèses simplificatrice qui sont les suivantes:

- La membrane est homogène et neutre,
- Les flux ioniques sont indépendants les uns des autres,
- Les régions intra et extracellulaires sont homogènes et stables,
- Les principaux ions considérés sont les ions monovalents (valence de 1),
- L'épaisseur de la membrane étant très faible (7 à 9 nm) par rapport à son extension latérale celle-ci est considérée comme uniforme, plane et infini. De ce fait, les

concentrations et les potentiels ioniques seront pris en compte sur un seul plan x (une dimension).

La valeur du potentiel de repos Em de la cellule dans le cas d'une membrane perméable à trois types d'ions est donnée sous la forme :

$$Em = \frac{R \cdot T}{F} \times \ln\left(\frac{P_{Na} + \left[N_{a^+}\right]_{ext} + P_{K^+} + \left[K^+\right]_{ext} + P_{Cl^-} + \left[Cl^-\right]_{ext}}{P_{Na} + \left[N_{a^+}\right]_{\text{int}} + P_{K^+} + \left[K^+\right]_{\text{int}} + P_{Cl^-} + \left[Cl^-\right]_{\text{int}}} \right)$$

Avec :

- P_i coefficient de perméabilité de la membrane en $cm.s^{-1}$à un ion i,
- [*i*] la concentration de l'espèce *i* dans le milieu intra et extracellulaire,
- R la constante de gaz parfaits = $8,314 J.mol^{-1}.K^{-1}$,
- T la température absolue, en degré kelvin,
- F la constante de Faraday qui représente la charge globale 'une mole de charges élémentaires = 9,649.10-4 $C.mol^{-1}$.

Le coefficient de perméabilité Pi est :

$$P_i = \frac{D_i \cdot \beta_i}{h}$$

Avec :

- Bi le coefficient de partition,
- Di le coefficient de diffusion de l'ion i dans le milieu considéré,
- H l'épaisseur de la membrane.

Si l'on ne considère qu'une seule conductance d'ion, une seule perméabilité rentre en compte dans le calcul, les autres étant nulle. L'équation se réduit à l'équation de Nernst.
La valeur du potentiel de repos type est de -40 à - 90 mV.

Annexe 2 :

Protocoles de modèle des supports biologiques utilisés

1. Les Tranches de rétine.

Les rétines sont obtenues à partir de souris mâles pigmentées CB57BL/6, âgées de 4-6 semaines. Les souris sont tuées par élongation sans utilisation d'anesthésiant. Les yeux sont prélevés et disséqués. La rétine prélevée est mise à plat, et elle est incluse dans de l'agarose qui est un des deux constituants de l'agar. Le gel d'agarose est constitué d'un assemblage de chaînes poly-osidiques reliées par les liaisons d'hydrogène (Type LM-3 Low melting point 1.5 % température de gélification : 24.5 °C ; température de fusion 1.5 % : 65.3 °C) à 3 %. Des tranches transversales (de 200 µm d'épaisseur) de rétine incluse dans de l'agarose sont obtenues au vibratome (Microm HM 650V, Microm International). L'étape de tranchage est effectuée à 4°C . Ces tranches de rétine sont ensuite oxygénées par un mélange de gaz (95 % oxygène et 5 % dioxyde de carbone) et perfusées par une solution saline Ringer[2], concentration en mM (NaCl 135 ; KCl 5 ; MgCl21 ; CaCl2 2 ; glucose 10 ; HEPES 10 ; Phenol Red 0,001%) pH 7.4 et maintenues à température ambiante. Cette méthode de préparation de tranche de rétine permet de garder les cellules viables pendant cinq à six heures. Au cours des tests, la tranche de rétine incluse dans un gel d'agarose à 3 % est maintenue au fond de la chambre à l'aide d'un treillis de nylon sur un support en «U » de platine. Elle est placée sous l'objectif 60X d'un microscope (Olympus BX 51W1), perfusée par de la solution Ringer, oxygénée à un débit continu de 200-250 ml/hr avec un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments). La température de la chambre est maintenue à 28 - 30 °C en réchauffant l'arrivée de la solution de perfusion à l'aide d'un contrôleur de température TC-324B Single Channel (Harvard Apparatus). Le bain est en permanence renouvelé par un système d'aspiration. Les cellules ganglionnaires sont identifiées par leur position dans la tranche (la couche des cellules ganglionnaires est adjacente à la couche fibreuse du nerf optique) et selon la forme de leur corps cellulaire.

[2] La solution de RINGER permet de garder l'équilibre osmotique des cellules hors de leur milieu habituel. Elle est donc plus compatible physiologiquement avec les micro-organismes sensibles que le sérum physiologique.

2. Cultures de cellule ganglionnaire de la rétine.

Les yeux de souris nouveau-nés sont prélevés en milieu stérile et sont ensuite disséqués. Les rétines récupérées subissent un traitement enzymatique (papaïne) à 37 °C. L'arrêt de la digestion enzymatique se fait avec de l'ovomucucoïde, un inhibiteur de l'enzyme. Après une étape de centrifugation, la suspension cellulaire contenant les cellules rétiniennes subit une dissociation mécanique par aspiration et refoulement avec une pipette. Une étape supplémentaire de centrifugation permet de récupérer le culot cellulaire qui est ensuite re-suspendu dans un milieu contenant des billes aimantées adsorbées d'un anticorps spécifique Thy 1.2 qui reconnait une protéine membranaire située sur les CGR. Cette mixture est introduite dans une colonne LS Miltenyl biotec qui permet de séparer les cellules. On récupère au final les CGR que l'on place dans un milieu physiologique adapté placé dans une couveuse sous oxygène. Dans ce milieu, une semaine au minimum leur sera nécessaire pour retrouver leur fonctionnalité et un stade de développement suffisant pour des tests.

3. Cultures de cellule ganglionnaire de l'appareil vestibulaire.

La procédure reste très proche de la culture de CGR mais permet de garder les cellules gliales autour des cellules ganglionnaires. Le protocole est donc moins traumatisant pour les cellules, ce qui rend le temps de croissance des cellules moins important que celui nécessaire aux cellules rétiniennes.

Annexe 3 :

Modélisation de la génération et la propagation de la chaleur. Programme réalisé avec le logiciel FLEX PDE.

```
TITLE 'TemperatureSortieFibre'    { the problem identification }
COORDINATES ycylinder('R','Z')
VARIABLES
Temperature          { Temperature }

DEFINITIONS    { parameter definitions }
CapaCal=4350 {J.kg-1.K-1, Capacité calorifique de l'eau}
Densite=1000     {kg.m-3, Densité de l'eau}
ConducTh=0.63  {W.m-1.K-1, Conductivite thermique de l'eau à 37 degrés = 0.63}
{TRelaxTh=50e-3  {s, temps relaxation thermique}}

Abs1872=30{21.5; // 1/cm, Absorption en 1/cm dans l'eau à 1872 nm}
Abs1879=30{ 1/cm, Absorption en 1/cm dans l'eau à 1879 nm : 30}
Abs1530=12.8 { 1/cm, Absorption en 1/cm dans l'eau à 1530 nm}
Abs1470=30{ 1/cm, Absorption en 1/cm dans l'eau à 1470 nm}


TempsPulse=20e-3      {s, temps du pulse}
PmW=430{mW, puissance laser en sortie de fibre}
{SurfaceFibre=(3.14*(50e-6)^2)}

SurfaceFibre=(3.14*(50e-6*z+109.9e-6)^2)
Abso = Abs1530*100
Rayon1=50e-6
Rayon2=1000e-6
xR=20
xZ=70
DeltaTemps=1e-3
PWm2=PmW*1e-3/SurfaceFibre
TempsFinal=0.15    {s}

{EnergieJ=ImW*1e-3*TempsPulse    {J, Energie en sortie de fibre en Joule}}

Source=Abso*PWm2*exp(-Abso*z){*exp(-(50e-6*z+59.9e-6)^2)}


INITIAL VALUES
Temperature=300  {K, Temperature initiale = 26 degrés}

EQUATIONS
{div(ConducTh*grad(Temperature)) = CapaCal*Densite*dt(Temperature)}
div(ConducTh*grad(Temperature)) + Source = CapaCal*Densite*dt(Temperature)
```

```
  Source=0
  START(0,0)
  {MESH_SPACING = 100e-6}
  LINE TO (xR*Rayon1,0)
  LINE TO (xR*Rayon1,xZ*Rayon1)
  LINE TO (0,xZ*Rayon1)
  TO CLOSE
 REGION 2     {Source=petit rectangle à l'interieur du grand rectangle}
  Source = IF t<TempsPulse THEN Abso*PWm2*exp(-Abso*z){*exp(-(50e-6*z+59.9e-6)^2)}
  ELSE 0
  START(0,0)
  NATURAL(Temperature)=0    LINE TO (Rayon1,0)
  NATURAL(Temperature)=0    LINE TO (Rayon2,xZ*Rayon1)
  NATURAL(Temperature)=0    LINE TO (0,xZ*Rayon1)
  NATURAL(Temperature)=0    LINE TO CLOSE

  {LINE TO (Rayon1,0)
  LINE TO (Rayon2,xZ*Rayon1)
  LINE TO (0,xZ*Rayon1)
  LINE TO CLOSE}

TIME 0 TO TempsFinal by DeltaTemps   { if time dependent }

MONITORS       { show progress }
  for t = 0 by DeltaTemps to TempsFinal
  elevation(Temperature-273) from (0,0.5e-6) to (1e-3,0.5e-6)  range=(30,60) as "Surface Temp"
  {elevation(Temperature-273) from (0,200e-6) to (1e-3,200e-6)  range=(30,60) as "Surface Temp"}
elevation(Temperature-273) from (0,200e-6) to (0,1000e-6)  range=(30,60) as "Surface Temp"
  CONTOUR(Temperature-273)
PLOTS        { save result displays }
  {CONTOUR(Temperature)}

HISTORIES
{génération des courbes et sauvegarde dans un fichier texte }
   history(Temperature-273) at (50e-6,160e-6) (0,200e-6) (0,500e-6) (0,1000e-6)  export format "#t#1#2#3#4"file="ptable1.txt"
END
```

Bibliographie

[1] : R. W.Rodieck.
"La Vision ".
Neurosciencees & cognition, édition de boeck.

[2] : **http://lecerveau.mcgill.ca.**

[3] : http://pagesperso-orange.fr/biomaitrise/neurophy/neurophy3.htm.

[4] : World Health Organization.
"International Statistical Classification of Diseases, Injuries, and Causes of Death".
Vol. 1, 10th Rev. Geneva: WHO, 1992.

[5] : S. Resnikoff , D. Pascolini, D. Etya'ale, I. Kocur, R. Pararajasegaram, G. P. Pokharel, S. P. Mariotti.
"Global data on visual impairment in the year 2002".
Bull World Health Organ, 82(11), 844 - 51, 2004.

[6] : C. Veraart, F. Duret, M. Brelén, M. Oozeer, J. Delbeke.
"Vision rehabilitation in the case of blindness".
Expert Review of Medical Devices, 1, 139 - 153, 2004.

[7] : A. M. Maguire, F. Simonelli, E. A. Pierce et al.
"Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis".
N Engl J Med 358, 2240 - 2248, 2008.

[8] : J. W. B. Bainbridge, S. S. Barker, A. J. Smith.
"Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis".
N Engl J Med 358, 2231 - 2239, 2008.

[9] : C. Leroy.
"Où l'on rend compte de quelque tentative que l'on a faite pour guérir plusieurs maladies par l'électricité".
Hist Acad Roy Sciences (Paris), Mémoires math phys 95, 60 - 87, 1755.

[10] : T. Tink, C. J. Barnstable, J. F. Rizzo.
"Visual prosthesis and ophtalmic J Devices, New Hope in Sight".
Ed: Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007.

[11]: M. S. Humayun, J. D. Weiland, J. D. Weiland, G. Chader, Elias greenbaum.
"Artificial Sight Basic Research, Biomedical Engineering and Clinical Advances".
Ed: Springer, 2007.

[12]: M. S. Humayum, E. de Juan Jr, J.D. Weiland, G. Dagnelie, S. Katona, R. Greenberg, S. Suzuki.
"Pattern electrical stimulation of the human retina".
Vision research 39, 2569 - 2576, 1999.

[13]: T. M. O'Hearn, S. R. Sadda, J. D. Weiland, M. Maia, E. Margalit, M. S. Humayun.
"Electrical stimulation in normal and retinal degeneration (rd1) isolated mouse retina".
Vision Research 46, 3198 - 3204, 2006.

[14]: E. Zrenner, K.D. Milicsez, V.P.Gabel, H.G. Grafc, E. Guenthera, H. Haemmerleb, B. Hoefflingerc, K. Kohlera, W. Nischb, M. Schubertd, A. Stetta,b, S. Weiss.
"The development of subretinal microphotodiodes for replacement of degenerated photoreceptors".
Ophthalmic Res, 29, 269 - 280, 1997.

[15]: D. Besch, H. Sachs, P. Szurman, D. Gülicher, R. Wilke, S. Reinert, E. Zrenner, K. U. Bartz-Schmidt, F. Gekeler.
"Extraocular surgery for implantation of an active subretinal visual prosthesis with external connections: feasibility and outcome in sevenpatients".
Br J Ophthalmol, 92, 1361 - 1368, 2008.

[16]: A. Y. Chow, M. T. Pardue, J. I. Perlman, S. L. Ball, V. Y. Chow, J. R. Hetling, G. A. Peyman, C. Liang, E. B. Stubbs, N. S. Peachey.
"Subretinal implantation of semiconductor-based photodiodes: Durability of novel implant designs".
Journal of Rehabilitation Research and Development,. 39(3), 313 - 322, 2002.

[17]: A.Y. Chow, V.Y. Chow, K.H Packo, J. S. Pollack, G. A. Peyman, R. Schuchard .
"The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa".
Arch Ophthalmol, 122, 460-469, 2004.

[18]: M. S. Humayun.
"Intraocular retinal prosthesis".
Tr.Am.Ophth.Soc, 99, 271 – 300, 2001

[19]: M. S. Humayun, J. D. Weiland, G. Y. Fujii, R. Greenberg, R. Greenberg, R. Williamson, J. Little, B. Mech, V. Cimmarusti, G. V. Boemela, G. Dagnelie, E. de Juan.
"Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis".
Vision Research 43, 2573 - 2581, 2003.

[20]: D. Yanai, J. D. Weiland, M. Mahadevappa, R. J. Greenberg, I. Fine, M. S. Humayun.
"Visual performance using a retinal prosthesis in three subjects with retinitis pigmentosa".
American Journal of Ophthalmology, 143, 820 - 827, 2007.

[21]: J. F. Rizzo, J. Wyatt, J. Loewenstein, S. Kelly, D. Shire.
"Perceptual efficacy of electrical stimulation of human retina with a microelectrode array during short term surgical trials".
Investigative Ophthalmology and Visual Science, 44, 5362 - 5369, 2003.

[22]: N. H. Lovell, J. Hallum, E. Chen, S. Dokos, P. Byrnes-Preston, R. Green, L. Poole-Warren, T. Lehmann, G. J. Suaning.
"Advances in retinal neuroprosthetics".
Handbook of Neural Engineering, Akay (ed), Wiley IEEE press, 2007.

[23]: R. Eckmiller, D. Neumann, O. Baruth.
"Tunable retina encoders for retina implants: why and how".
J Neural Engineering, 2, S91, 2005.

[24]: J. Salzmann, O. P. Linderholm , J-L Guyomard, M. Simonutti, M. Paques, M. Lecchi, J. Sommerhalder, M. Pelizzone, D. Bertrand, J. Sahel, P. Renaud, A.B. Safran, S. Picaud.
"Subretinal electrode implantation in the P23H rat for chronic stimulations".
J. Ophthalmol, 90, 1183 - 1187, 2006.

[25]: A. P. Fornos, J. Sommerhalder, A. Pittard, A. B. Safran,M. Pelizzone.
"Simulation of artificial vision: IV. Visual information required to achieve simple pointing and manipulation tasks".
Vision Res, Ophthalmologiy Clinic, 48, 1705 - 1718, 2008.

[26]: M. Paques, M. Simonutti, M. J. Roux, S. Picaud, E. Levavasseur, C. Bellman, J-A. Sahel.
"High resolution fundus imaging by confocal scanning laser ophthalmoscopy in the mouse".
Vision Research 46, 1336 - 1345, 2006.

[27]: D. R. Bertschinger, E. Beknazar, Manuel Simonutti.
"A review of in vivo animal studies in retinal prosthesis research".
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 246, 1505 - 1517, 2008.

[28]: C. Veraart, J. Delbeke, M.-C. Wanet-Defalque A. Vanlierde, G. Michaux, S. Parrini, O. Glineur, M. Verleysen, C. Trullemans, J.T. Mortimer.
"Selective stimulation of the human optic nerve".
IFESS'1999 proceedings, 57 - 59, 1999.

[29]: M.C.Wanet-Defalque, J. Delbeke, G.Michaux, A. Vanlierde, SParrini and C.Verraart.
"A visual prosthesis based on electrical stimulation of the optic nerve".
ed: Springer Berlin Heidelberg, IFMBE Proceedings, 19, 54 - 57, 2008.

[30]: J. Delbeke, M. C. Wanet-Defalque, B. Gerard.
"The microsystems based visual prosthesis for optic nerve stimulation".
Artificials organs, 26(3) 232 - 234, 2002.

[31]: X. Chai, L. Li, K. Wu, C. Zhou, P.Cao, Q. Ren.
"C-Sight Visual Prostheses for the Blind".
Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE, 27 (5), 20 - 28, 2008.

[32]: W. H. Dobelle.
"Artificial vision for the blind by connecting a television camera to the brain".
ASAIO Journal, 46, 3 - 9, 2000.

[33]: R. A. Normann, E. M. Maynard, P .J .Rousche, D. J. Warren.
"A neural interface for a cortical vision prosthesis".
Vision research 39, 2577 - 2587, 1999.

[34]: G. Dagnelie.
"Prosthetic vision: Exploring its qualities and limits by means of simulations".
4e Symposium scientifique sur l'incapacité visuelle et la réadaptation, 2001.

[35]: E. Marg.
"Magnetostimulation of vision: Direct noninvasive Stimulation of the retina and the Visual Brain".
Optopmetry and Vision Science, 68 (6), 427-440 , 1999.

[36]: L. Autret, I. Mechaly, F. Scamps, J. Valmier, P. Lory, G. Desmadryl.
"The involvement of $Ca_V3.2/\ \alpha_{1H}$ T-Type calcium channels in excitability of mouse embryonic primary vestibular neurones".
J Physiol, 567 (1), 67 - 78, 2005.

[37]: J. Yu, B. A. Daniels, W. H. Baldridge.
"Slow Excitation of Cultured Rat Retinal Ganglion Cells by Activating Group I Metabotropic Glutamate Receptors".
J Neurophysiol 102, 3728 - 3739, 2009.

[38]: A. B. Uzdensky.
"Isolated neuron response to blue laser micro irradiation: Phenomenology and possible mechanism".
Lasers in Medical Science, 14, 276 - 282, 1999.

[39]: E. Vuori, T. M. T. Tervo, J. M. Holopainen.
"Laser refractive correction of myopia in visually impaired patients improves visual acuity",
Acta Ophthalmologica, 2009.

[40]: J. L. Alió, A. Artola, F.A. Rodriguez-Mier.
"Selective zonal ablations with excimer laser for correction of irregular astigmatism induced by refractive surgery".
Ophthalmology, 107, 662 - 673, 2000.

[41] A. B. Majji.
"Paramacular Von Hippel angioma with tractional macular detachment".
Ophthalmic Surg Lasers, 33, 145 - 147, 2002.

[42]: D. M. Berson, F. A. Dunn, M. Takao.
"Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock".
Science, 295, 1070 - 3, 2002.

[43]: E. M. Callaway, R. Yuste.
"Stimulating neurons with light".
Current Opinion in Neurobiology 12, 587 - 592, 2002.

[44]: R. H. Kramer, J. J. Chambers, D. Trauner.
"Photochemical tools for remote control of ion channels in excitable cells".
Nat. Chem. Bio, 1, 360 - 365, 2005.

[45]: E. Boydes, F. Zhang, A. Bamberg, G. Nagel, K. Daisseroth.
"Milliscecond-timescale, genetically targeted optical control neural activity".
Nature Neuroscience, 8, 1263 - 1268, 2005.

[46]: J. Wanga, M. T. Hasan, H. S. Seung.
"Laser-evoked synaptic transmission in cultured hippocampal neurons expressing channelrhodopsin-2 delivered by adeno-associated virus".
Journal of Neuroscience Methods 183, 165-175, 2009.

[47]: K. Nikolic, Nir Grossman, K. Nikolic, N. Grossman, J. Burrone , C. Toumazou, P. Degenaar.
"Photocycles of Channelrhodopsin-2".
Photochemistry and Photobiology, 85, 400 - 411, 2009.

[48]: D. Ghezzi, A. Menegonc, A. Pedrocchib, F. Valtortac, G. Ferrignob.
"A Micro-Electrode Array device coupled to a laser-based system for the local stimulation of neurons by optical release".
Journal of Neuroscience Methods 175, 70 - 78, 2008.

[49]: M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. trainer, R. Kramer.
"Ligth-activated ion channels for remote control of neuronal firing".
Nature Neuroscience, 7, 1381 - 1386, 2004.

[50]: X. Han, E. S. Boyden.
"Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution".
PLoS ONE, 2, e299, 2007.

[51]: K. Nikolic, N. Grossman, H. Yan, E. Drakakis,C. Toumazou, P.Degenaar..
"A Non-Invasive Retinal Prosthesis - Testing the Concept".
Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 6365 - 6368, 2007.

[52]: R. L. Fork.
"Laser stimulation of nerve cells in Aplysia".
Science, 171, 907 - 908, 1971.

[53]: P. Balaban, R. Esenaliev, T. Karu, E. Kutomkina, V. Letokhov, A. Oraevsky, N. Ovcharenko.
"He-Ne laser irradiation of single identified neurons".
Lasers Surg Med 12, 329-337, 1992.

[54]: G.Allegre, S. Avrillier, D. Albe-Fessard.
"Stimulation in the rat of a nerve fiber bundle by a short UV pulse from an excimer laser".
Neurosci.Lett, 180, 261 - 264, 1994.

[55]: H. Hirase, V. Nikolenko, J. H. Goldberg, R. Yuste.
"Multiphoton stimulation of neurons".
Journal of Neurobiology. 51 (3), 237 - 247, 2002.

[56]: J. Wells, C. Kao, K. Mariappan, J. Albea,E. Duco-Jansen, P.Konrad, A. Mahadevan-Jansen.
"Optical stimulation of neural tissue in vivo".
Optics letters 30 (5), 504 - 506, 2005.

[57]: J. Wells, C. Kao, P. Konrad, A. Mahadevan-Jansen, E.Duco-Jansen.
"Biophysical mechanisms responsible for pulsed low-level laser excitation of neural tissue".
Progress in biomedical optics and imaging, 7, 60840.1 - 60840.7, 2007.

[58]: I. U. teudt, A-E. Nevel, A. D. Izzo, J. T. Walsh, C-P. Richter.
"Optical Stimulation of the facial nerve: a new monitoring technique?".
The Laryngoscope, 117:1641 - 1647, 2007.

[59]: A. D. Izzo, J. T. Walsh, H. Ralph, J. Webb, M. Bendett, J. Wells, C-P. Richter.
"Laser stimulation of auditory neurons: effect of shorter pulse duration and penetration depth".
Biophysical Journal, 94 (8), 3159-3166, 2008.

[60]: A. D. Izzo, E. Duco-Jansen, J. Y. Walsh.
"Laser Stimulation of Auditory Nerve".
Lasers in Surgery and Medicine, 38:745 - 753, 2006.

[61]: C-P. Richter, R. Bayon, A. Izzo, M. Otting, E. Suh, S. Goyal, J. Hotaling, J. T. Walsh Jr.
"Optical stimulation of auditory neurons: Effects of acute and chronic deafening".
Hearing Research 242 (1-2), 42 - 51, 2008.

[62]: R. G. McCaughey, C. Chlebicki, B. J. F. Wong.
"Novel Wavelengths for Laser Nerve Stimulation".
Lasers in Surgery and Medicine, 42 (1), 69 - 75, 2009.

[63]: J. Wells, P. Konrad, C. Kao,E. Duco-Jansen, A. Mahadevan-Jansen.
"Pulsed laser versus electrical energy for peripheral nerve stimulation".
Journal of Neuroscience Methods, 163, 326 - 337, 2007.

[64]: J. D. Wells, S. Thomsen, P. Whitaker, E. Duco-Jansen, C. C. Kao, P. E. Konrad, A. Mahadevan-Jansen.
"Optically Mediated Nerve Stimulation: Identification of Injury Thresholds".
Lasers in Surgery and Medicine, 39, 513 - 526, 2007.

[65]: A. D. Izzo, J. T. Walsh, E. Duco-Jansen, J. Webb, M. Bendett, J. Wells, C-P. Richter.
"Optical Parameter Variability in Laser Nerve Stimulation: A Study of Pulse Duration, Repetition Rate, and Wavelength".
IEEE Trans Biomed Eng, 54, 1108 - 1114, 2007.

[66]: C. Gargini, E. Terzibasi, F. Mazzoni, E. Strettoi.
"Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study".
Journal of Comparative Neurology, 500, 222 - 238, 2007.

[67]: E. Neher, B. Sakmann.
"Voltage-dependence of drug-induced conductance in frog neuromuscular junction".
Proc Natl Acad Sci U S A, 72, 2140 - 2144, 1975.

[68]: Y. Rouillard, J. Angellier, A. Salhi, P. Grech, F. Chevrier.
"GaInAsSb/AlGaAsSb laser diodes for the 2-3 µm range".
Proceedings of SPIE, 5738, 120 - 129, 2005.

[69]: B. P. Bean.
"The action potential in mammalian central neurons".
Nat Rev Neurosci, 5738, 8, 451 - 465.

[70]: J. M. Brunetaud, S. Mordon, T. Desmettre et C. Beacco.
"Applications thérapeutiques des lasers".
EDP Sciences, 2002.

[71]: B. Cox.
"Introduction to Laser-Tissue Interactions".
Ed: PHAS 4886 Optics in Medicine, 2007.

[72]: M. Niemz.
"Laser-tissue interactions: fundamentals and applications".
Ed: Springer, 2002.

[73]: L. Y. Matsuoka, J. Wortsman, J. G. Haddad, P. Kolm, B. W. Hollis.
"Racial pigmentation and the cutaneous synthesis of vitamin".
Arch Dermatol, 127, 536 - 538, 1991.

[74]: A. Juarranz, P. Jaén, F. Sanz-Rodríguez, j. Cuevas, S. González.
"Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications".
Clin Transl Oncol, 10, 148 - 154, 2008.

[75]: H. Sailer, K Shinoda. G. Blatsios, K. Kohler, L. Bondzio, E. Zrenner, F. Gekeler.
"Investigation of thermal effects of infrared lasers on the rabbit retina: a study in the course of development of an active subretinal prosthesis".
Ed: Springer-Verlag, 2006.

[76]: S. Liang, F. Yang, C. Zhou, Y. Wang, S. Li, C. K. Sun, J- L. Puglisi, D. Bers, C. Sun, J. Zheng.
"Temperature-dependent Activation of Neurons by Continuous Near-infrared Laser".
Cell Biochem Biophys, 53, 33 - 42, 2009.

[77] : G. Desmadryl, J-M. Chambard, J. Valmier, A. Sans.
"Multiple voltage dependent calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons".
Neuroscience, 78 (2), 511 - 522, 1997.

[78]: K. Narender, Dhingra, Michael A, Freed, Robert. G. Smith.
"Voltage-Gated Sodium Channels Improve Contrast Sensitivity of a Retinal Ganglion Cell Temperature".
The Journal of Neuroscience, 25(35), 8097 - 8103, 2005.

[79]: R. G. McCaughey, C. Chlebicki, B. J. F. Wong.
"Novel Wavelengths for Laser Nerve Stimulation".
Lasers in Surgery and Medicine, 42 (1), 69 - 75, 2009.

[80]: B. I. Lange, T. Brendel, G. Höttmann.
"Temperature dependence of light absorption in water at holmium and thulium laser wavelengths".
Applied Optics, 41 (27), 5797 - 5803, 2002.

Etude de la stimulation laser de neurones pour des applications de prothèses visuelles

Résumé

Ce travail se situe dans le cadre d'un projet pluridisciplinaire visant à développer une prothèse visuelle. La technique la plus utilisée actuellement dans de nombreux types de neuroprothèses est basée sur l'excitation par voie électrique via des électrodes. Les inconvénients d'une telle technique (très invasive, de faible résolution spatiale et par contact) pourraient être surmontés en utilisant une stimulation par laser infra-rouge. Nous présentons dans un premier temps les caractéristiques des trois diodes lasers fibrés émettant à 1875 nm, 1535 nm et 1470 nm pour des gammes de puissances optiques de quelques centaines de mW qui ont été utilisés et intégrés à deux dispositifs de mesures permettant l'observations de variations d'échanges ioniques transmembranaires (imagerie de fluorescence des ions calciums et mesure électrophysiologique par la technique de patch clamp). Nous montrons ensuite que des réponses biologiques ont été obtenues par les trois lasers, non seulement sur des cellules ganglionnaires de la rétine et du vestibule de culture mais aussi sur des tranches de rétine. L'influence des paramètres clés comme la longueur d'onde, la durée de stimulation, les seuils d'énergie a été étudié, et a permis d'établir que les seuils d'énergie de stimulation dépendent de la valeur du coefficient d'absorption de l'eau qui varie suivant la longueur d'onde utilisée. Enfin, une étude est consacrée pour expliquer les mécanismes physiques et biologiques apparaissant au cours de l'interaction du laser avec le neurone au niveau cellulaire. Des simulations numériques quantifiant l'élévation de température associées à des tests pharmacologiques cherchant à déterminer la nature des canaux ioniques spécifiques mis en jeu suggèrent la prédominance d'un effet thermique.

MOTS-CLES : Stimulation laser; neurone; cellule ganglionnaire rétinienne; prothèse rétinienne; implant rétinien.

Study of the laser stimulation of neurons for retinal prosthesis applications

Abstract

This work is part of a pluridisciplinary project, aiming at developing a visual prosthesis. The most used technique for this kind of neuroprosthesis is based on the electrical stimulation of nerves by electrodes. Drawbacks of such a technique (very intrusive, low spatial resolution and physical contact) could be overcome by the use of an infra red laser based stimulation. We present first the three fibre pigtailed laser diode characteristics emitting few hundred of mW at 1875 nm, 1535 nm and 1470 nm. These lasers have been integrated on two measurement devices (a fluorescence microscope and a microscope using patch clamp recording), for the observation of ionic membrane exchanges. Our results show that action potentials have been obtained by laser stimulation from the three lasers, both on retinal or vestibular ganglion cells from mass cultures and on retinal slices. The effect of key parameters as the wavelength, the stimulation time, the energy thresholds has been studied and show that the energy thresholds clearly depend on the absorption coefficient of water which varies with the wavelength. Finally, we present the results of a preliminary study aiming at determining the biophysical interaction mechanisms at cell level. Numerical simulations giving the local increase of temperature and tests of specific blocking molecules in order to know the exact nature of the ionic channels involved suggest a predominant thermal mechanism.

KEYWORDS : Laser stimulation; neuron; retinal ganglion cell ; visual prosthesis; retinal implant.

DISCIPLINE Electronique.