

## Résumé des recherches de Fabrice Bardin pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches

Ce document présente un résumé de mes activités de recherche sur l'interaction lumière-matière pour des applications de soudure/formage laser et biochimiques menées au sein de l'université Heriot-Watt d'Edimbourg puis au laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Graduate School de Palaiseau/Orsay, et pour des applications de stimulation optique de neurones menées depuis 2007 à l'université de Nîmes et à l'Institut d'Electronique et des Systèmes.

Après avoir effectué une thèse sur un capteur à fibre optique à gradient d'indice inversé basé sur la résonance plasmon de surface à l'université de Saint-Etienne, j'ai ensuite élargi mes domaines de compétences en instrumentation optique, interaction laser-matière et instrumentation laser en tant que chercheur contractuel au sein de l'équipe « Applied Optics and Photonics » de l'université Heriot-Watt à partir de janvier 2002. J'ai en effet travaillé sur l'étude et le contrôle de la soudure laser et sur l'encapsulation de microsystèmes par chauffage local laser. Un dernier projet a porté sur l'étude et le contrôle du formage laser.

J'ai travaillé de 2002 à 2004 dans le cadre du projet européen MMFSC (Manufacturing and Modelling of Fabricated Structural Components) dont le but a été de développer de nouvelles techniques de fabrications et d'analyses pour le design et la construction de composants de moteurs aéronautiques. J'ai été impliqué dans la partie du projet concernant les processus de soudure par lasers Nd:YAG de fortes puissances. Mon rôle a été de mettre au point des techniques de contrôle en temps réel du processus de soudure laser puisque il est en effet vital de s'assurer que chaque soudure est exempte de défauts pour des applications aéronautiques (porosités, fissures ou pénétration partielle). J'ai donc conçu un dispositif basé sur des photodiodes et une caméra rapide permettant l'acquisition et l'analyse de la radiation lumineuse émise par le point de soudure. L'étape finale a été de réaliser le traitement des informations en temps réel de manière à pouvoir maîtriser l'état de la soudure. Le système de contrôle de la pénétration qui a été développé est ainsi capable de modifier en temps réel la puissance du laser en fonction d'une large gamme de changements d'épaisseur des pièces à souder pour assurer une pénétration totale optimale. J'ai testé les performances des différents capteurs en situation réelle en réalisant leur intégration et leur optimisation sur un laser Nd:YAG de 4kW au CLFA (Coopération Laser Franco-Allemande) à Bagneux et sur un laser Nd:YAG de 2,5 kW à l'université de Trollhättan/Uddevalla (HTU) en Suède. Les échantillons ainsi que les tests de qualité des soudures ont été réalisés en collaboration avec les motoristes SNECMA Moteurs (France) et Volvo Aero Corporation (Suède), participant également au projet en tant qu'utilisateurs finaux.

J'ai ensuite poursuivi des recherches sur la conception de capteurs optiques pour le contrôle en temps réel de la soudure par conduction. L'objectif du projet a été de construire un système simple et peu coûteux permettant l'optimisation de la pénétration par le contrôle de la température du bain de fusion. J'ai développé et testé un capteur pyrométrique original à deux longueurs d'onde, basé sur une caméra couleur standard, capable de contrôler la température du bain de fusion en temps réel dans une gamme 1800-3000°C en modifiant la taille du faisceau laser en temps réel (contrôle de la distance focale).

Enfin, j'ai travaillé en parallèle sur deux projets mettant en jeu l'échauffement localisé par laser. J'ai ainsi mené une étude sur l'interaction laser-polymère pour des applications microsystèmes, en réalisant une étude de faisabilité d'encapsulation de microsystèmes par chauffage localisé par laser de polymère thermodurcissable en collaboration avec le laboratoire IMEC (Louvain, Belgique). Cette étude a ainsi montré les potentialités de cette

approche et une thèse a démarré par la suite. En parallèle, j'ai travaillé sur le contrôle du processus du formage laser de pièces métalliques. Cette technique est fondée sur la génération d'un gradient de température obtenu par échauffement localisé par un faisceau laser en mouvement. L'expansion du matériau, chauffé localement et limitée par le métal environnant, peut induire si la limite d'élasticité du matériau est dépassée, une contraction permanente lors du refroidissement, entraînant l'apparition de courbures. J'ai participé au développement d'un modèle simplifié décrivant les deux phénomènes principaux du formage laser: courbures par gradient de température et par contraction.

En résumé, ces quatre années passées à l'université d'Heriot-Watt m'ont permis d'approfondir les connaissances précédemment acquises en interfaçage optique et fibre optique et d'acquérir de solides compétences en traitement d'images et de données (Matlab et Labview). J'ai d'autre part acquis de nouvelles connaissances en soudure et formage laser, sur l'interaction laser de puissance-matière et sur l'instrumentation laser. J'ai de plus pris part à un travail de gestion des projets assez important. J'ai eu en effet à gérer la préparation de tous les aspects des expériences en relation avec mes partenaires (achats du matériel, choix des expériences), à réaliser les expériences (certaines hors sites et pour un temps limité), à analyser et à présenter les résultats sous forme de présentations orales (réunions ou conférences) et de rapports écrits (rapports techniques d'avancement de projets réguliers et publications).

J'ai rejoint le **laboratoire Charles Fabry de l'institut d'Optique Graduate School** en janvier 2006 pour travailler sur l'étude d'un montage multi-spectral à plasmon de surface pour des applications biopuces. J'ai développé dans ce cadre un imageur unidimensionnel multi-spectral qui autorise l'acquisition de la courbe complète de la résonance plasmon d'une ligne de plots en temps réel. Cette technique permet de garder les avantages des dispositifs à plasmon de surface mono-capteur (0D), notamment en termes de robustesse et de rapport signal sur bruit (du fait de la prise en compte d'une large partie de la courbe), tout en introduisant une dimension spatiale supplémentaire de mesure. Une amélioration d'un facteur 3 à 4 en sensibilité pour un changement d'indice de réfraction a été obtenue par comparaison avec une détection par caméra en 2D. Une démonstration de principe a également été validée sur le suivi d'une vingtaine d'interactions biomoléculaires (ADN-ADN) en temps réel et en parallèle.

J'ai été recruté en février 2007 à l'**université de Nîmes** en tant que maître de conférences pour renforcer l'équipe STINIM de l'**Institut d'Electronique et des Systèmes** (UMR CNRS, Université Montpellier 2, Montpellier). J'ai intégré le programme LASDOP (LASer Driven Optical Prosthesis) qui a pour but la conception de prothèses visuelles par stimulation laser pour des personnes atteintes de maladies de la rétine. Cette partie met en jeu des compétences sur l'interaction laser-matière et en optique. J'ai participé puis pris en charge la partie « physique » du projet concernant la stimulation laser de neurones en collaboration les équipes « physiopathologie et thérapie des désordres vestibulaires » et « équipe génétique et thérapie des cécités rétiniennes » de l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM, CNRS, INSERM). Depuis 2011, j'ai initié une nouvelle collaboration avec l'équipe « Somesthésie » de l'INM pour poursuivre ces travaux. En parallèle, je participe à une nouvelle thématique de recherche concernant la régénération nerveuse sous illumination par diodes électroluminescentes (LED).

Je participe également depuis 2008 au laboratoire interne MIPA (Mathématiques Informatique Physique et Applications) reconnu par l'université de Nîmes. Cette structure fédère et développe la recherche et les échanges dans les trois disciplines des licences PC et MI et de la future licence envisagée de Mathématiques autour des thématiques « Calcul des

Variations, Analyse non Linéaire et Applications », « Matériaux », « Instrumentation Optique » et « Image sécurité multimédia et vision pour la robotique ».

Les paragraphes suivant détaillent les deux thématiques actuelles de mes recherches :

Stimulation de neurones par laser infra-rouge :

Le principe d'une prothèse visuelle est d'enregistrer les informations d'une scène (par une caméra), puis de renvoyer les informations pertinentes à un stimulateur (le plus souvent rétinien). Certaines maladies (comme la rétinite pigmentaire ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge « DMLA ») détruisent les cellules photosensibles de la rétine et entraînent la cécité, alors que le nerf optique et le cortex visuel restent en partie fonctionnels. Les prothèses en cours d'expérimentation sur l'homme utilisent des réseaux d'électrodes positionnés au niveau de la rétine, sur le cortex visuel ou sur le nerf optique, de manière à stimuler électriquement les neurones (hors photorécepteurs) encore fonctionnels. L'équipe STINIM de l'IES a monté un programme de conception de prothèse visuelle à partir de 2006 en collaboration avec l'ARAMAV (clinique de réadaptation pour déficients visuels située à Nîmes), le service ophtalmologie du CHU de Nîmes et l'Institut des Neurosciences de Montpellier. Une partie du projet vise à définir quelles informations pertinentes doivent être envoyées sur un stimulateur constitué d'une centaine de points (type réseau d'électrodes), dans l'objectif d'augmenter l'autonomie et la sécurité des personnes implantées dans leurs déplacements. Une autre partie du projet concerne l'étude d'une technique de stimulation optique de neurones. La majorité des neuroprothèses actuelles sont basées sur une stimulation d'origine électrique. Toutefois, ce type de stimulation présente des inconvénients, notamment en ce qui concerne la stimulation de la rétine qui est un tissu très fin, fragile et difficile d'accès. C'est pourquoi d'autres techniques de stimulations sont étudiées. Depuis une dizaine d'année, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'utilisation de laser émettant dans l'infra-rouge pour la stimulation de neurones. Cette technique est en effet non invasive, sans contact et de meilleure résolution spatiale que la stimulation par électrodes.

Une thèse a démarré sur ce projet en février 2007. J'ai participé à l'encadrement de ce travail sur l'interaction laser-neurone dans l'objectif de déclenchement de potentiels d'action (influx nerveux) sur des neurones de culture. Une seconde thèse réalisée à l'INM a démarré un an après en parallèle sur les aspects biologiques de la thématique. Toutes les préparations biologiques de neurones de culture de rétine et du vestibule et les expériences de mesures de potentiels membranaires (technique de patch clamp) ont été réalisées dans ce cadre. Mon travail et celui des doctorants se sont portés sur :

- la mise au point du montage de stimulation laser,
- l'optimisation des paramètres physiques de la stimulation laser,
- les mécanismes biophysiques mis en jeu.

Notre choix s'est porté sur l'achat de diodes lasers fibrées émettant à 1875, 1535 et 1470 nm un signal de l'ordre de 100-400 mW en sortie d'une fibre optique de 105 microns de diamètre de cœur. Une source de courant continue de 4A a été utilisée et pilotée par une carte d'acquisition/stimulation via un programme Labview de manière à obtenir des pulses de quelques millisecondes. Une fibre optique dénudée puis polie en bout a été utilisée pour amener le signal de stimulation à quelques centaines de microns des neurones de culture sur deux microscopes, l'un équipé d'une station de patch clamp permettant des mesures d'électrophysiologie et un autre d'imagerie de fluorescence.

La démonstration de stimulation contrôlée non destructif de neurones de la rétine et du vestibule par laser infra-rouge a été apportée. Des réponses biologiques ont été observées par la mesure de variations d'échanges ioniques transmembranaires réalisée par deux méthodes de

mesures (imagerie calcique et mesures électrophysiologiques). Ces résultats ont permis d'établir des seuils d'énergie au niveau du neurone pour déclencher des potentiels d'action variant de 15 à 100 J/cm<sup>2</sup>, dépendant de la puissance lumineuse et du temps des pulses. Les seuils de dommage ont été observés visuellement sur l'apparence et la taille des neurones stimulés et avec un colorant vital. Ces seuils sont clairement au dessus des seuils de stimulation, permettant une stimulation non létale reproductible. D'autre part, des stimulations par des trains de pulses lasers à 1, 2 et 10 Hz pendant des dizaines de minutes ont confirmé la nature non destructif de la stimulation laser. 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 cellules.

L'étude de la littérature a montré que la stimulation neuronale par laser infra rouge dans nos gammes de puissance est liée à l'effet thermique, c'est-à-dire à une augmentation locale de température suite à l'absorption d'énergie par l'eau entourant ou constituant le neurone. Nous avons voulu confirmer cette hypothèse en déterminant :

- l'augmentation de température générée par les pulses lasers,
- l'existence de canaux ioniques transmembranaires spécifiques responsables des potentiels d'action.

Un modèle numérique a été développé pour quantifier l'élévation de température engendrée par le pulse laser. Les résultats du modèle montrent une augmentation de température de 20 °C à 55-60 °C. Ces valeurs de températures sont clairement en dessous du seuil d'endommagement des cellules pour des temps d'exposition aussi court, même si une étude plus complète doit être menée afin de vérifier l'innocuité de cette gamme de température sur le long terme. Des mesures locales de température du bain autour des neurones ont été réalisées et ont confirmé l'augmentation de température. Le même seuil de température permettant le déclenchement de potentiels d'action a été obtenu indépendamment de différents seuils d'énergie et temps d'exposition, suggérant qu'une valeur précise de température est nécessaire et non un gradient de température.

En parallèle des études sur la température, des tests pharmacologiques ont été menés pour déterminer l'origine biophysique du déclenchement des potentiels d'action. Ces travaux ont montré que des canaux sodium et calcium voltages dépendants sont mis en jeu lors des variations du potentiel membranaire. De plus, des bloqueurs sélectifs à certains canaux dépendants à la température ont permis d'identifier les canaux ioniques de type TRPV4 comme déclencheur des réponses biologiques.

Pour poursuivre le travail de compréhension des mécanismes de stimulation de neurones par laser, j'ai par la suite initié une nouvelle collaboration avec l'équipe « Somesthésie » de l'INM qui travaille sur le traitement de neuropathies périphériques. Un travail de thèse a ainsi démarré en 2011 sur cette thématique, cofinancé par l'école doctorale I2S de Montpellier et l'université de Nîmes avec le soutien matériel de l'équipe associée de l'INM. Les objectifs de ce travail en cours sont de confirmer le mécanisme biophysique sur un nouveau type cellulaire : neurone primaire de culture provenant de ganglions dorsaux rachidiens de souris adultes,

Le déclenchement de potentiels d'action (PA) par pulses laser infra-rouge a été confirmé sur ces neurones. Ce travail a montré que des canaux ioniques sodiques ont été impliqués et qu'un nombre restreint de neurones pouvaient être déclenchés de façon non létale par pulse laser. La gamme d'énergie de seuil est similaire à celle obtenue précédemment pour les neurones vestibulaires et des cellules ganglionnaires de la rétine. Nos résultats montrent aussi que l'amplitude des dépolarisations membranaires sont non affectées par des bloqueurs des canaux ioniques dépendants à la température mais dépendent du gradient de température et non d'une température absolue. Cela suggère que les dépolarisations membranaires déclenchées par laser IR sont compatibles avec un mécanisme capacitif dépendant du gradient de température. En revanche, le déclenchement de PA nécessite la présence de canaux ioniques spécifiques.

Les prochains axes de recherche concernent l'étude de l'existence de longueurs d'onde optimales permettant une stimulation optique déportée pour des applications de prothèses et de tester la stimulation par laser IR in-vivo de région du système nerveux comme la substance noire qui est impliquée dans la maladie de Parkinson. Cela pourrait ouvrir la voie à de nombreuses applications de stimulation neuronale sans modification génétique.

Régénération nerveuse sous illumination LED faible puissance :

De nombreuses études ont montré l'action de lasers ou LEDs faibles puissances sur des tissus biologiques, comme par exemple l'accélération de la cicatrisation ou la diminution d'inflammation. Cette méthode a en effet l'avantage d'être non-invasive et d'être localisée. De nombreuses études présentent toutefois des résultats contradictoires. Cela s'explique par le fait que les mécanismes d'action biophysiques ne sont pas encore complètement élucidés et par le grand nombre de paramètres d'illumination (longueur d'onde, dimension de la zone illuminée, puissance, temps d'exposition ...) qui rend difficile le choix optimum de ces paramètres. De plus, les caractéristiques optiques de l'illumination ne sont dans de nombreuses études pas suffisamment précisées pour permettre des comparaisons. Le caractère non uniforme des faisceaux (le plus souvent gaussien) et l'absorption par les différents milieux ne sont la plupart du temps pas pris en compte : l'énergie effectivement reçue par les cellules est ainsi rarement présentée.

Je participe depuis 2012 à un nouvel axe de recherche concernant l'accélération de la régénération nerveuse sous illumination LED et structuration du substrat. Nous avons montré que l'illumination de quelques minutes par une LED à 645 nm de neurones sensitifs primaires ayant subi un traumatisme in-vivo induisait une accélération significative de la pousse des axones. Dans ce projet, j'ai mené l'étude du niveau d'énergie arrivant sur les neurones de culture, en prenant en compte le caractère gaussien des sources et de l'absorption par les différents milieux traversés. La preuve de principe ayant été réalisée, il reste à :

- déterminer de façon rigoureuse les paramètres optiques optimaux de l'accélération (longueur d'onde, puissance, temps d'exposition),
- étudier l'influence du site d'action : corps cellulaire, axones, ou terminaisons. En vue d'applications thérapeutiques, il est en effet primordial de savoir par exemple si l'illumination des terminaisons, plus facile d'accès, est efficace.