

# THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ LILLE 1

Spécialité :

**Instrumentation et Analyse Avancée**

*Thèse de doctorat :*

**Instrumentation biophotonique pour la mesure d'interactions moléculaires  
dans la cellule.**

*Présentée par*

**Corentin Spriet**

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR en Sciences Pour l'Ingénieur de l'UNIVERSITÉ LILLE 1

Soutenue le 18 décembre 2006 devant le jury composé de :

<b>Sandrine Lévêque-Fort :</b> <i>Chargée de Recherche CNRS, LPPM, Orsay, France.</i>	Examinatrice
<b>Fabienne Mérola :</b> <i>Directrice de Recherche, CNRS, LCP, Orsay, France.</i>	Examinatrice
<b>Jacques Barbillat :</b> <i>Chargé de Recherche CNRS, LASIR, USTL, Villeneuve d'Ascq, France.</i>	Président
<b>Laurent Héliot :</b> <i>Ingénieur de Recherche CNRS, IRI, LILLE, France.</i>	Directeur
<b>Jörg Langowski :</b> <i>Professeur, DKFZ, Heidelberg, Allemagne.</i>	Rapporteur
<b>Patrick Tauc :</b> <i>Directeur de Recherche CNRS, ENS-CACHAN, Cachan, France.</i>	Rapporteur
<b>Bernard Vandenbunder :</b> <i>Directeur de Recherche CNRS, IRI, LILLE, France.</i>	Co-directeur.



## Remerciements

J'exprime ma profonde gratitude à **Jörg Langowski** et à **Patrick Tauc** pour avoir accepté la charge d'être rapporteurs de cette thèse et pour la rapidité de lecture de mon manuscrit. *Ein besonderen Dank an Jörg Langowski sich trotz der vielen Verpflichtungen die Zeit für viele Stunden im Zug zwischen Heidelberg und Lille genommen zu haben.* Merci également à **Patrick Tauc** pour sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse aux cours de nos différents échanges.

Un grand merci également à **Fabienne Mérola**, **Sandrine Lévêque-Fort**, **Bernard Vandebunder**, **Laurent Heliot** et **Jacques Barbillat**, qui ont accepté d'être examinateurs de ce travail de thèse. Merci également pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir ensemble au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier plus particulièrement les membres du jury ayant participé à l'encadrement de ce travail :

Tout d'abord **Bernard**, qui a accepté d'être mon directeur de thèse, pour ses conseils qui m'ont été précieux, en particulier lors de la rédaction des différentes publications issues de ce travail ainsi que pour sa grande disponibilité et son aide précieuse lors des dernières étapes de ce travail.

**Laurent**, à la fois d'un point de vue professionnel, pour m'avoir donné le goût de la microscopie et pour toutes les choses que j'ai pu apprendre à ses côtés au cours de ces dernières années, et d'un point de vue plus personnel pour son amitié et sa sympathie.

**Jacques**, qui m'a accompagné sur la route de l'instrumentation dédiée au SLiM et avec qui les échanges ont toujours été aussi fructueux que sympathiques.

Merci à **Dave Trinel**, complice de sciences et de café, à la fois pour son aide lors de mes débuts en programmation, mais aussi pour toutes ces choses qui participent à rendre la vie d'un laboratoire si plaisante. Merci également à **François Waharte**, « Huggy » officiel du laboratoire et camarade d'instrumentation, pour nos échanges pendant et après son séjour au laboratoire ainsi qu'à **Didier Deslee** pour son aide et ses conseils.

Merci à **Dominique Dumas** pour les échanges entre nos deux laboratoires et pour son accueil lors de mes passages à Nancy. Merci également à **Elisabeth Werkmeister** pour notre travail commun sur l'utilisation du *cavity dumper*. Je remercie également **Sophie Laffray** pour sa sympathie et son efficacité, que ce soit au cours de notre travail sur le récepteur GABA<sub>B</sub>, ou lors des différentes périodes de rédactions que nous avons rencontrées. Dans le même

contexte, un grand merci à Julien **Yockell-lelièvre** et **Tatiana Karpova** pour les échanges entrepris aux cours de nos travaux communs, ainsi qu'à **Arndt Benecke** et à son équipe, en particulier à **Amel Attmane** que ce soit pour notre travail commun, pour nos discussions philosophiques ou pour son rire si communicatif. Je tiens également à remercier **Yves Usson** pour la pédagogie et la sympathie de nos discussions dans des contextes aussi variés que la rédaction d'articles ou les simulations *Monte Carlo*.

Merci beaucoup à **Laurence Labaye** pour son aide dans les méandres de l'administration, et pour son soutien, en particulier au cours de ces aventures que furent les MiFoBio. Un grand merci également à **Ines Bonet**, pour son aide, mais également pour nos différents échanges culturels et pour sa sympathie tout au long de ces années.

De façon collective, un grand merci aux différents membres du **GDR2588** et du **RTmfm** avec qui j'ai interagi, et qui, au travers des différentes manifestations que nous avons organisées, m'ont permis d'apprendre énormément de choses, que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain. Un grand merci également aux services techniques et informatiques de l'IBL, en particulier à **Marc Messemanne** et **Hubert Wennekes**, pour leur aide et pour « le tournevis qui manque pour faire marcher la manip ».

Merci à **Zoulika Kherrouche** pour ses « bons tuyaux », ses récits du bout du monde et pour tous ces bons moments passés ensemble ainsi qu'à **Lionel Marcon** pour nos longues discussions aux thèmes aussi variés qu'enrichissants. Merci également à vous deux pour votre amitié. Merci également à deux amis de toujours, **Maxime Lagoue**, le seul homme à rester intéressant, même quand il me parle de football et **Nicolas Thales**, le guildmaster le plus dévoué de sa génération.

Un grand merci à mes parents, **Christine et Alain Spriet**, et à ma sœur, **Mathilde Spriet**, qui m'ont soutenu avec amour, gentillesse et compréhension tout au long de ces années. Merci encore pour ça, et pour tout le reste.

Enfin, un très grand merci à **Sandrine Castelain**, qui sillonne avec moi cette route depuis le début. Merci pour ton aide, en particulier pour les multiples corrections de ce manuscrit, ainsi que pour ton soutien et toutes ces autres choses qui rendent ces années à tes côtés si agréables...

*Ce travail à été réalisé au sein de l'équipe « Biophotonie Cellulaire Fonctionnelle » de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire (FRE 2963) à Lille. Il a été financé par une bourse de la région Nord Pas de Calais Picardie.*

<b>Résumé.....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des abréviations :.....</b>	<b>11</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>12</b>
<b>Section.1 Contexte biologique.....</b>	<b>12</b>
a Le noyau .....	13
i) Organisation fonctionnelle du noyau .....	13
(1) Introduction : .....	13
(2) Organisation de la chromatine : .....	14
(3) Organisation fonctionnelle du noyau en domaine et foci .....	15
(4) Remodelage de la chromatine et régulation transcriptionnelle : .....	15
ii) Le complexe CBP/TDG .....	17
b La membrane plasmique .....	19
i) Rappels.....	19
ii) Le récepteur GABA <sub>B</sub> .....	21
<b>Section.2 Etudes de la dynamique des interactions moléculaires.....</b>	<b>24</b>
a La fluorescence .....	25
i) Principe .....	25
(1) Efficacité des sondes fluorescentes .....	26
(2) Propriété de la fluorescence émise .....	27
(3) Sensibilité à l'environnement .....	29
ii) Les molécules fluorescentes endogènes .....	30
iii) Les molécules fluorescentes exogènes .....	30
iv) Les protéines de la famille des GFP .....	31
v) Les boîtes quantiques ou « quantum dots » (Qdots).....	33
b La microscopie de fluorescence pour l'étude des interactions .....	35
i) Microscopie à épifluorescence classique.....	35
ii) CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy).....	38
iii) L'excitation à deux photons .....	41
c Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer).....	43
i) Théorie .....	43
ii) Exemples de méthodes de mesure basées sur l'intensité de fluorescence .....	46
iii) Méthode de mesure basée sur la polarisation de fluorescence : déclin d'anisotropie de fluorescence : .....	47
iv) Méthode de mesure du temps de vie de fluorescence .....	48
(1) Dans l'espace des fréquences .....	48
(2) Dans l'espace temps .....	50
(3) Bilan sur les techniques de mesure de temps de vie .....	52
v) Complexité de l'interprétation des mesures de FRET .....	53
(1) Complexité liée à la mesure.....	53
(2) Interprétation des données .....	56
d FCS .....	59
<b>II. Mesures de temps de vie de fluorescence. ....</b>	<b>60</b>
<b>Section.1 Métrologie .....</b>	<b>60</b>
a Composition du système .....	60
b Electronique des cartes de comptage de photons Becker et Hickl (B&H).....	65
i) Vue d'ensemble de la carte .....	65
ii) Les éléments constitutifs de la carte .....	65
(1) CFD et SYNC.....	65
(2) TAC.....	66
(3) ADC .....	67
iii) Architecture mémoire.....	68
(1) Mémoire à flux continu .....	68
(2) Mémoire FIFO.....	68
(3) Mémoire matricielle multicouche.....	69

c	Instrumentation (71).....	71
i)	Caractérisation instrumentale du système d'acquisition.....	71
(1)	Mesures du bruit :.....	71
(2)	Capacité d'excitation à 2 et 3 photons.....	71
(3)	Mesure de la réponse instrumentale :.....	72
(4)	Mesures de temps de vie de fluorescence sur des échantillons standardisés :.....	74
(5)	Reproductibilité du système :.....	74
ii)	Conditions d'utilisation du système.....	75
(1)	Détermination des conditions limites d'utilisation du système.....	75
(2)	Effet de la concentration du fluorophore en solution.....	79
(3)	Compétiteurs collisionnels ou « quenching » de fluorescence :.....	79
(4)	Mesures de temps de vie sur un mélange de deux espèces fluorescentes :.....	80
(5)	Mesures en cellules vivantes.....	81
<b>Section.2</b>	<b>Optimisations instrumentales : .....</b>	<b>83</b>
a	Les sources d'excitation.....	83
i)	Implémentation du « cavity dumper » sur le Ti :Sa.....	85
(1)	Introduction :.....	85
(2)	Mise en place du système :.....	86
(3)	Caractérisation du système.....	88
ii)	Implémentation du t-Pulse accompagné du module de dispersion spectrale.....	94
iii)	Perspectives : autres sources d'excitation possibles.....	100
b	Les détecteurs :.....	101
c	Première application : étude des interactions Jun/Erg en cellule vivante.....	104
i)	FRET par photoblanchiment de l'accepteur.....	104
ii)	FRET par mesure de FLIM.....	108
<b>Section.3</b>	<b>Méthodes d'analyse des courbes de déclin de fluorescence.....</b>	<b>110</b>
a	Optimisation de l'ajustement des courbes de déclin de fluorescence.....	110
i)	Présentation du logiciel SPCImage (B&H).....	110
ii)	Limitations rencontrées.....	112
iii)	Développement d'une plateforme ouverte d'analyse des courbes de déclin : le logiciel Titan.....	113
(1)	Modes d'ajustement des données sous Titan.....	114
(2)	Ajustements et minimums locaux d'énergie :.....	115
(3)	Segmentation rationnelle.....	116
(4)	Conclusion.....	117
b	Choix du modèle d'ajustement et images hétérogènes.....	118
i)	Problème d'ajustement pour les images de temps de vie.....	118
ii)	Utilisation de la variation du $\chi^2$ .....	119
iii)	Application du système de choix de modèle en cellules vivantes.....	120
c	Etude du complexe CBP-TDG.....	126
i)	CBP/TDG et récepteur à l'acide rétinoïques (RAR).....	126
ii)	CBP TDG et SUMOylation.....	128
iii)	Bilan.....	130
<b>III. Nouvelle instrumentation dédiée à l'acquisition de données de SLiM.....</b>		<b>132</b>
<b>Section.1</b>	<b>Mise en œuvre du système.....</b>	<b>133</b>
a	Description générale du système.....	133
b	Le SPRC-160.....	135
i)	Description du système de mesure de SLiM.....	135
ii)	Le système de dispersion spectrale.....	136
iii)	Le détecteur multi-anodes : le PML16.....	139
iv)	Logiciels d'acquisition et d'analyse.....	141
<b>Section.2</b>	<b>Caractérisation du système de mesure de SLiM.....</b>	<b>142</b>
a	Mesure de la fonction de réponse de l'instrument (IRF).....	142
b	Mesure du bruit du système.....	143
c	Calibration spectrale.....	144
d	Calibration des mesures de temps de vie.....	145
e	Optimisation des conditions d'acquisition pour le travail en cellules vivantes.....	146

<b>Section.3 Applications des mesures de SLiM.....</b>	<b>148</b>
a Quantification de deux espèces fluorescentes présentant un fort chevauchement spectral.....	148
b Imagerie de temps de vie et de spectre de fluorescence en cellule vivante.....	150
c Mesures de SLiM localisées dans la cellule vivante.....	152
<b>Section.4 Optimisation de l'analyse et application à l'étude du récepteur GABA<sub>B</sub>.....</b>	<b>155</b>
a Optimisation de l'analyse des données de SLiM.....	155
b Application biologique : étude de l'interaction entre le récepteur GABA <sub>B</sub> et 1433ζ.....	162
<b><i>IV. Synthèse, conclusions et perspectives.....</i></b>	<b><i>165</i></b>
<b>Section.1 Bilan général.....</b>	<b>165</b>
a Le FLIM pour l'étude du FRET.....	165
b Le SLiM.....	166
c Limitations actuelles.....	167
<b>Section.2 Perspectives.....</b>	<b>169</b>
a Etude dynamique des interactions.....	169
i) Solutions instrumentales.....	169
ii) Solutions analytiques.....	169
b Compréhension des machineries moléculaires complexes.....	171
c Complexité et modélisation.....	173
<b><i>Références bibliographiques :</i></b> .....	<b><i>175</i></b>
<b><i>Matériel et méthodes:</i></b> .....	<b><i>180</i></b>
<b><i>Publications associées à ce travail.....</i></b>	<b><i>184</i></b>

## **Résumé**

La cellule est un système tridimensionnel complexe et dynamique. L'ensemble de ses fonctions est régulé par la formation de complexes multi-protéiques. L'étude de la formation de ces complexes dans la cellule est donc une question rencontrée de façon ubiquitaire en biologie. Différentes techniques permettent d'observer ces interactions moléculaires. Nous avons choisi d'utiliser l'étude FRET (Förster Resonance Energy Transfer) par mesure de temps de vie de fluorescence, cette technique étant le meilleur compromis entre invasivité et précision des résultats. En particulier, notre approche repose sur le comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC), cette technique étant la plus sensible et la plus précise. Ce manuscrit présente les différentes optimisations que nous avons apportées aux systèmes de mesure de temps de vie classiquement utilisés en microscopie. Pour cela, nous avons tout d'abord optimisé l'instrumentation liée à cette technologie en implémentant de nouvelles solutions d'excitation et de mesure. Après une caractérisation de ces éléments, nous avons testé différentes améliorations de l'analyse des données, en particulier pour tenir compte de l'hétérogénéité des interactions lors d'expériences d'imagerie de temps vie de fluorescence réalisées sur cellule. Malgré ce système d'acquisition, différentes questions restent complexes à résoudre en utilisant les mesures de FLIM seules. Nous avons donc développé et caractérisé un système de mesures corrélées de spectre et de temps de vie de fluorescence (SLiM). L'exploitation de ces données dans les études de FRET sera également discutée. Chacun de ces systèmes de mesures de FRET a été appliqué à différentes problématiques biologiques dont nous détaillerons les exemples les plus représentatifs au cours de ce manuscrit.

## **Abstract**

The cell is a complex and dynamic 3d structure which functions are regulated by multi-proteins complexes formations. The study of these complex assemblies is then a ubiquitous question in biology. Several techniques allow molecular interactions studies in cell. We have chosen the fret studies performed by fluorescence lifetime measurements, while it is the best compromise between cell invasivity and results accuracy. Our approach relies on time correlated single photon counting (TCSPC), which is the most sensitive and precise lifetime determination method.

This manuscript presents the different optimizations we performed compared to classical lifetime measurement systems used in microscopy. First of all, we optimized instrumentation used in photon decay curves measurements with adapted excitation sources and detectors. After a rigorous characterization step of these new instruments, we have proposed several optimizations in data analysis, as for example a solution to take into account interactions heterogeneity during lifetime imaging experiment applied to cell studies.

Even with such an acquisition system, several questions remain really complex to address using lifetime measurements alone. We have then developed and characterised a correlated fluorescence spectrum and lifetime (SLiM) measurements system. Exploitation of SLiM data applied to fret will also be discussed.

Both those fret measurements systems have been applied to several biological questions from which we will develop the most representative along this manuscript

## Liste des abréviations :

<b>ADC</b> : Analogic Digital Converter	<b>HAT</b> : Histone Acétyltransférase
<b>ADN</b> : Acide DésoxiriboNucléique	<b>IRF</b> : Instrumental Response Function
<b>APD</b> : Avalanche Photodiode	<b>MCP-PMT</b> : Micro Chanel Plate PMT
<b>APE</b> : Apurinic Endonucléase	<b>PML</b> : Promyelocytic Leukemia Protein
<b>ARN</b> : Acide RiboNucléique	<b>PMT</b> : Photomultiplier Tube
<b>B&amp;H</b> : Becker And Hickl	<b>POC</b> : Perfusion Open And Closed Cultivation
<b>CBP</b> : <i>Creb-Binding Protein</i>	<b>PSF</b> : Point Spread Function
<b>Cerulean</b> : Cerulean Fluorescence Protein	<b>Qdots</b> : Quantum Dots
<b>CFD</b> : Constant Fraction Discriminator	<b>RA</b> : Retinoic Acid
<b>CFP</b> : Cyan Fluorescence Protein	<b>RAR</b> : Retinoic Acid Receptor
<b>COM</b> : Component Object Model	<b>SLiM</b> : Spectral And Lifetime Measurements
<b>DLL</b> : Dynamic Link Library	<b>TAC</b> : Time Amplitude Converter
<b>DsRed</b> : <i>Discocoma</i> Red Fluorescent Protein	<b>TCSPC</b> : Time Correlated Single Photon Counting
<b>FCCS</b> : Fluorescence Cross Correlated Spectroscopy	<b>TDG</b> : Thymidine-Dna Glycosidases
<b>FCS</b> : Fluorescence Correlated Spectroscopy	<b>Ti :Sa</b> : laser Titane Saphir
<b>FIFO</b> : First In First Out	<b>Ti:Sa</b> : Titane Saphir
<b>FLIM</b> : Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy	<b>TPE</b> : Two Photon Excitation
<b>FRAP</b> : Fluorescence Recovery After Photobleaching	<b>XFP</b> : variant de la GFP
<b>FRET</b> : Förster Resonance Energy Transfer	<b>YFP</b> : Yellow Fluorescent Protein
<b>FWHM</b> : Full Width at Half Maximum	$\lambda$ : Longueur d'onde
<b>GABA</b> : Gamma-Amino Butyric Acid	$\tau$ : Temps de vie de fluorescence
<b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein	

## **I. Introduction**

### **Section.1      *Contexte biologique.***

Les phénomènes biologiques sous-tendant les mécanismes complexes de la vie ont pour point commun d'être régis par des interactions intermoléculaires. Ces interactions ont souvent lieu au sein de "machines moléculaires" résultant de l'assemblage de différentes espèces de macromolécules. On trouve de telles machines pour assurer la réplication de l'ADN, la transcription, l'épissage, le transport nucléo-cytoplasmique, la traduction des protéines et leur dégradation et les cascades de signalisation. Les structures du cytosquelette comme le fuseau mitotique, les complexes de la signalisation cellulaire, l'enveloppe nucléaire, l'appareil de Golgi, les structures responsables de l'adhérence et de la motilité cellulaire, illustrent toutes à leur manière la notion d'assemblage dynamique.

Une meilleure description des interactions moléculaires au sein de ces complexes est essentielle pour la compréhension des mécanismes régissant les différentes fonctions cellulaires et de leurs dérèglements dans des processus pathologiques (cancer, maladies dégénératives, ...). Ce type d'étude est désormais possible grâce à l'utilisation de techniques combinables à la microscopie (FCS, BRET, FRET, FRAP, FLIM...). Cependant, chaque problématique biologique présente des contraintes particulières nécessitant le développement ou l'adaptation d'outils, tant au niveau instrumental qu'analytique.

Au cours de ce mémoire, nous allons détailler différents modèles d'études localisés au sein du noyau et de la membrane plasmique. Nous présenterons en particulier les optimisations que nous avons apportées aux systèmes classiques de mesures de FRET et la façon dont ces améliorations ont permis une meilleure compréhension des phénomènes à l'œuvre.

## **a Le noyau**

*L'organisation du noyau est un élément important dans la régulation de l'expression des gènes (9). Cette organisation change en réponse à des stimuli extérieurs, au cours du cycle cellulaire et des processus de différenciation; elle est perturbée au cours des processus pathologiques, comme le cancer ou les maladies dégénératives. Parallèlement aux études globales (description du transcriptome) rendues possibles grâce au séquençage de génomes entiers, les études topologiques et dynamiques de l'organisation fonctionnelle du noyau sont aujourd'hui des voies d'approches essentielles pour comprendre les mécanismes de la régulation génique. Le développement de ces études pose des problèmes spécifiques qui sont notamment dus à la faible quantité de molécules impliquées.*

### **i) Organisation fonctionnelle du noyau**

#### **(1) Introduction :**

Le noyau est une structure hautement organisée dont les différents territoires correspondent à des domaines fonctionnels spécialisés et morphologiquement définis. La structure, le volume et la position de ces domaines nucléaires sont modulés en fonction du cycle cellulaire, de la différenciation, de la prolifération ou de l'inhibition cellulaire (10,11). Dans le noyau interphasique, les différents chromosomes occupent des territoires spécifiques. Les gènes actifs tendent à se localiser à la périphérie de ces territoires qui correspondent à l'euchromatine, l'hétérochromatine comportant par contre les gènes non transcrits (12-14). La conformation de la chromatine est hautement régulée par des mécanismes épigénétiques faisant intervenir différents mécanismes post-traductionnels des histones. Une part importante du volume nucléaire est occupée par différentes structures organisées. Ces structures sont responsables de fonctions différentes au sein de l'ensemble de l'activité nucléaire : duplication et transcription de l'ADN, maturation des ARNm, inactivation de protéines, structuration de la chromatine. Ces structures nucléaires ne sont pas statiques. De nombreuses interactions entre ces composants nucléaires apparaissent au cours du cycle. Une représentation spatio-temporelle permet de comprendre le déroulement des événements. L'étude de la dynamique nucléaire est réalisable par l'examen de cellules vivantes, rendu possible grâce à d'importantes avancées dans les domaines de la microscopie, de l'imagerie

(15,16) et des techniques de biologie moléculaire permettant l'expression de protéines chimères autofluorescentes (17).

## **(2) Organisation de la chromatine :**

La chromatine et les chromosomes ont été décrits depuis plus d'un siècle mais leur structure moléculaire n'a été comprise qu'à partir de la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Le premier niveau de l'organisation de la chromatine a été proposé par Kornberg *et al* en 1974 (18,19). Il prédit, entre autres, que les particules de chromatine visibles en microscopie électronique sont composées d'un octamère d'histone comprenant deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 associées avec environ 200 paires de base d'ADN. En 1997 le groupe de Timothy Richmond (20) a publié la structure du nucléosome à une résolution de 2.8 Å puis en 2002 à 1.9 Å (21) permettant ainsi de confirmer ce qui avait été prédit plus de 25 ans auparavant. Le nucléosome est donc composé d'un tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> central et de deux dimères H2A-H2B venant s'associer de chaque côté du tétramère, l'ADN s'enroulant autour de ces 8 protéines sur 146 pb, en réalisant 1.7 fois le tour de l'octamère d'histone (Figure.1.A). Les histones associées à l'ADN pour former le nucléosome sont de petites protéines ayant un poids moléculaire compris entre 12 et 16 kDa. Leur composition en acides aminés révèle qu'elles sont composées de plus de 20% d'arginine ou de lysine, faisant partie des protéines les plus basiques existantes. Elles sont également extrêmement bien conservées évolutivement soulignant ainsi leur importance biologique.

Lors de l'interphase, lorsque les chromosomes sont invisibles, les premiers biologistes à avoir observé le noyau par des marquages cytologiques ont décrit deux types de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine, ainsi qu'une autre structure nucléaire très dense qu'ils ont appelée le nucléole. Par la suite grâce au développement des techniques de biologie, ces différents domaines ont pu être caractérisés d'une manière plus approfondie (pour revue voir (22)). L'euchromatine est une chromatine qui est transcriptionnellement active alors que l'hétérochromatine est au contraire une chromatine inactive.

La chromatine est constituée de 1/3 d'ADN, 1/3 de protéines appelées histones et de 1/3 d'autres protéines. Toutes ces protéines servent d'aide et de support à l'ADN pour qu'il puisse passer d'un état complètement condensé, représenté par le chromosome mitotique, à un état beaucoup plus ouvert, représenté par l'euchromatine

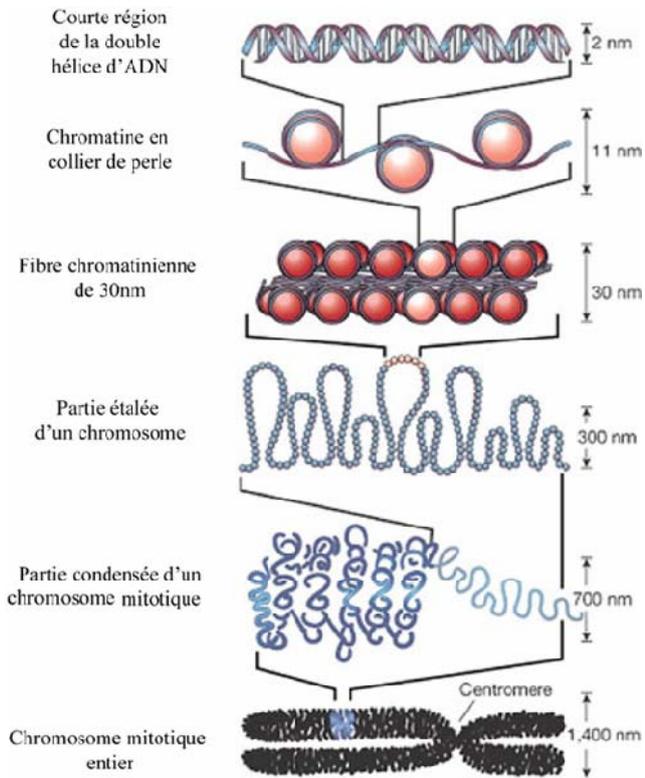
### ***(3) Organisation fonctionnelle du noyau en domaine et foci***

Depuis les années 90 un grand nombre de complexes protéiques de grandes tailles ont été mis en évidence dans le noyau. La plupart d'entre eux sont représentés dans la Figure.1.B. Les premières structures de ce type identifiées ont été des complexes participant à la transcription ou à la maturation des ARN. Des structures participantes à différents mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle ou d'assemblage et de routage de complexes entre protéines et petit ARN (Cajal Body, PML, Gem,...) ont été mises en évidence dans les noyaux (23). Ces structures sont en nombre variable mais le plus souvent constant entre cellules du même type. Par exemple on trouve environ 10 PML body par cellule. Certaines de ces structures sont associées à des régions spécifiques de la chromatine voire des gènes et sont constituées, pour certaines, de plusieurs dizaines de protéines qui sont pour partie fortement dynamiques et ce même au sein de structures fortement pérennes en apparence.

### ***(4) Remodelage de la chromatine et régulation transcriptionnelle :***

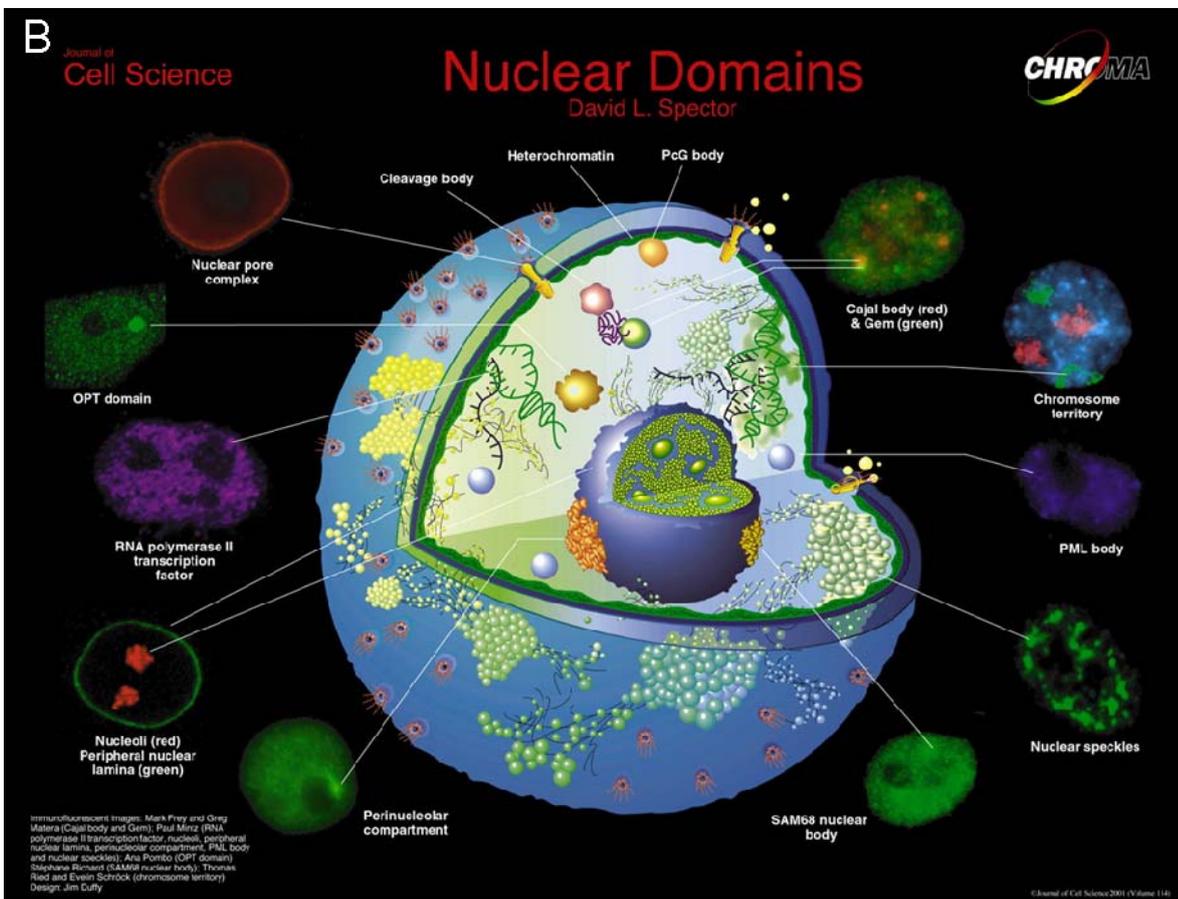
Des études génétiques et biochimiques ont mis en évidence l'existence de complexes constitués de plusieurs dizaines de composants, responsables du remodelage de la chromatine (24). Certains de ces complexes possèdent une activité d'acétylation ou de désacétylation des histones, et jouent un rôle de régulation positif ou négatif sur la transcription. Les facteurs de transcription, autres acteurs essentiels de cette régulation, reconnaissent des séquences spécifiques sur les promoteurs de leurs gènes cibles et interagissent avec la machinerie transcriptionnelle. L'existence d'interactions entre des histones-acétylases ou -désacétylases et ces facteurs de transcription, suggère un lien entre les complexes dynamiques qui assurent le remodelage de la chromatine et la transcription spécifique des gènes. Nous avons étudié en particulier le complexe CBP/TDG qui est impliqué dans la réparation de l'ADN par excision des bases erronées et dans la régulation transcriptionnelle via l'interaction avec des facteurs de transcription, tels que le récepteur à l'acide rétinoïque, et la modification des histones.

**A**



*I: organisation fonctionnelle du noyau :  
A: représentation de la structure de la chromatine à ses différents niveaux d'organisation (modifié de (1))  
B: organisation fonctionnelle du noyau présentant les principales structures identifiées (tiré de (3))*

**B**



## **ii) Le complexe CBP/TDG**

La régulation de l'expression des gènes est un processus particulièrement bien contrôlé. Pour cela, elle fait appel à différents facteurs qui devront être présents ensemble ou de façon séquentielle afin de contrôler l'expression d'un gène particulier à un moment et dans un type de tissu précis. Ainsi, le gène est flanqué de séquences régulatrices (promoteurs) qui contiennent des motifs amplificateurs (enhancers) (25), eux-mêmes régulés par différents facteurs de transcription. Ces derniers subiront également une régulation de leur activité par l'intermédiaire de co-activateurs et de co-répresseurs.

Un deuxième élément fondamental de la régulation des gènes provient de la structuration même de la chromatine, rendant plus ou moins accessibles les zones d'ADN ciblées. Un de ces modes de régulation épigénétique provient de la méthylation spécifique de cytosines. Cette méthylation peut alors conduire, après une désamination de la cytosine qui peut être spontanée ou réalisée par le truchement d'enzymes, à un mésappariement G:T qui sera réparé spécifiquement par les Thymidine-DNA Glycosidases (TDG) qui vont exciser la base erronée (T). L'activité de TDG sera suivie de celle d'une apurinic endonucléase (APE) qui intervient dans la réparation du site abasique formé par l'action de TDG. La méthylation de l'ADN jouant un rôle majeur dans le maintien de l'état transcriptionnellement inactif d'un gène dans les régions régulatrices, la production d'un mésappariement G:T suivi de sa réparation par TDG/APE contribue à la restauration d'un site non méthylé, transcriptionnellement actif (26-29). TDG présente différents autres rôles dans la cellule, en particulier comme co-régulateur direct de certains facteurs de transcription tels les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) (29) ; ces derniers participent à la transcription de gènes de façon promoteur et ligand dépendante.

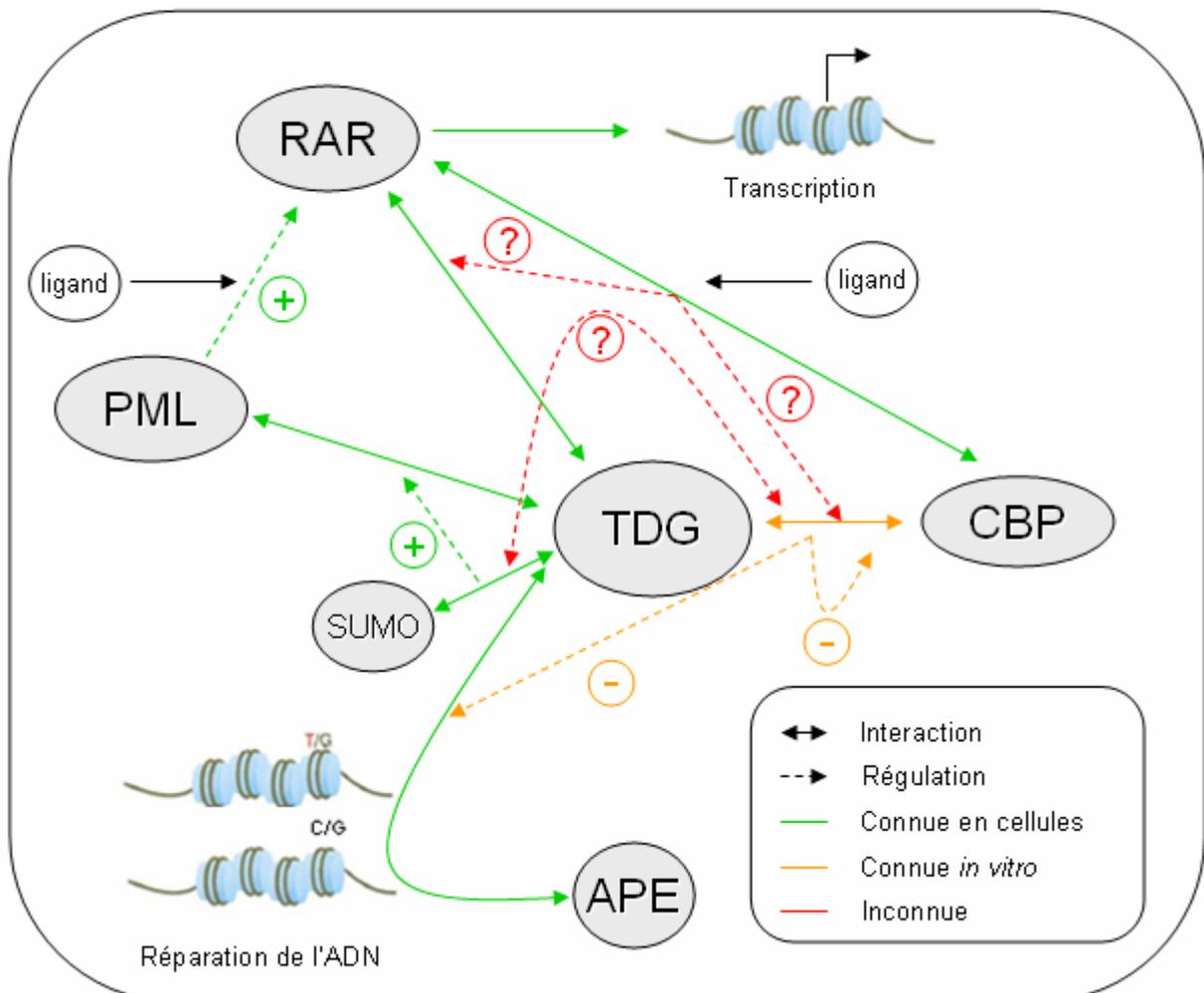
En plus de ce rôle direct, TDG intervient de façon indirecte sur l'activation de RAR. En effet, TDG peut être modifié de façon post-traductionnelle par la fixation de la protéine SUMO sur le groupement amine d'une lysine (30). Ce dernier acquiert alors une forte affinité et régule de façon positive PML (Promyelocytic Leukemia Protein). Le rôle principal de PML est de maintenir l'organisation des corps nucléaires mais il coactive également l'activité de RAR de façon ligand dépendante.

Il a également été montré récemment, *in vitro*, que TDG s'associe à une histone acétyltransférase (HAT), la *Creb-binding protein* (CBP), qui joue un rôle de co-activateur

pour de nombreux facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires (31), en particulier sur l'activité de RAR.

Il a été proposé que CBP puisse intervenir dans la réparation de l'ADN initiée par TDG, en remodelant la chromatine par acétylation des queues d'histone, de sorte de faciliter l'accès de TDG à la base erronée (32). Il a également été proposé que CBP acétyle TDG, cette acétylation induisant une dissociation de CBP du complexe, régulant négativement le recrutement d'APE. Sur la base de ces données, un rôle dans la régulation de la transcription après réparation a été suggéré pour le complexe CBP/TDG.

L'objectif de notre étude a tout d'abord été de confirmer l'interaction entre CBP et TDG dans leur contexte cellulaire. Dans un deuxième temps, nous avons voulu tester le rôle de CBP sur les modes de régulation opérés par TDG sur RAR que ce soit de façon directe ou par l'intermédiaire de la conjugaison de SUMO à TDG. La figure 2 fournit une représentation schématique des réponses recherchées situées dans leurs contextes.



2: représentation schématique des différentes interactions et régulation reliant TDG à la réparation de l'ADN et à la régulation de l'activité de RAR

## **b La membrane plasmique**

### *i) Rappels*

La membrane plasmique circonscrit le volume cytoplasmique contenant les organites de la cellule. Elle permet aussi de contrôler ou même de diriger sélectivement les échanges entre le cytoplasme et l'environnement de la cellule. Elle permet également une reconnaissance cellulaire spécifique et un échange d'informations avec son environnement proche. Cette fonction est particulièrement importante pour des cellules telles les neurones qui pourront alors transmettre un signal sur de longues distances.

La membrane plasmique est constituée de phospholipides, qui sont des molécules amphiphiles *i.e.* présentant une extrémité hydrophile et l'autre hydrophobe. Ils sont organisés *tête-bêche* formant ainsi une bicouche lipidique continue dont la face externe est hydrophile et la face interne hydrophobe.(33)

De nombreuses molécules sont enchâssées dans cette bicouche lipidique comme le cholestérol qui joue sur la fluidité de la membrane, et en particulier sur la température de transition mais aussi différents types de protéines qui pourront être extrinsèques, intrinsèques ou transmembranaires. Parmi ces dernières, de nombreuses protéines assurant un transport actif ou passif et subissant différents types de régulations.

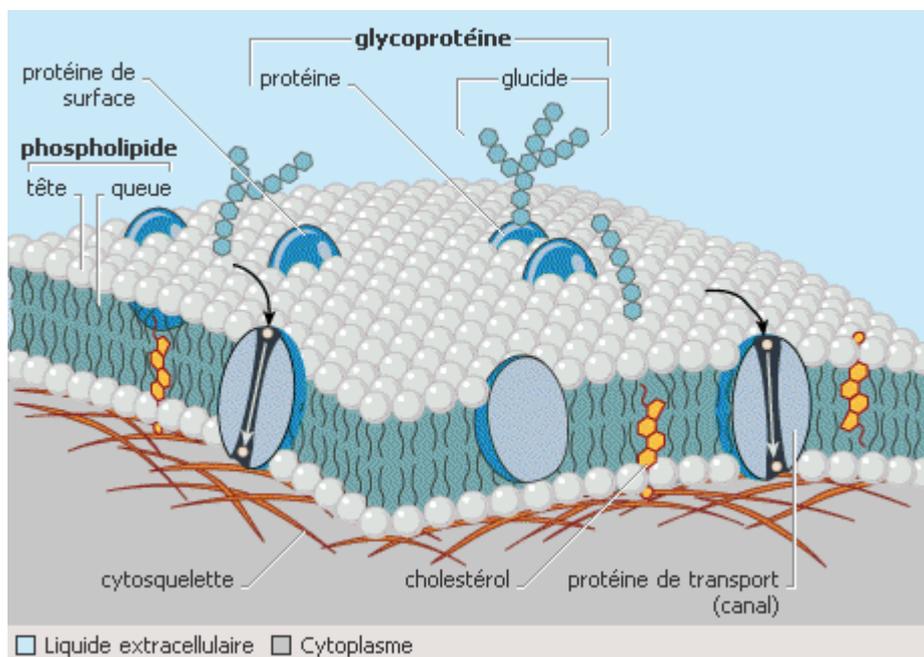
Les protéines de transport actif ont besoin d'énergie pour fonctionner. Les pompes utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP alors que les transporteurs utilisent l'énergie d'un gradient ionique comme celui du sodium.

Parmi les protéines de transport passif, on distingue celles qui assurent le transport des ions, les protéines canaux, et celles qui modulent le transport, les récepteurs liés aux protéines G. L'ouverture des canaux ioniques est régulée par un changement de potentiel de membrane ou par fixation d'un ligand.

Dans les neurones, on trouve de nombreux neurotransmetteurs (récepteurs canaux et récepteurs liés aux protéines G) qui assurent la transmission synaptique et sa modulation. La transmission synaptique rapide sera assurée par des protéines comprenant à la fois le site récepteur du neurotransmetteur et le canal ionique. Certaines sont perméables aux cations

comme les récepteurs nicotiques, d'autres seront plus spécifiques, comme le récepteur  $GABA_A$  qui sera perméable aux ions  $Cl^-$ .

La transmission synaptique lente et la régulation de la libération de neurotransmetteurs par l'élément présynaptique suivent des voies de signalisation différentes. En réponse à la fixation d'un ligand, par exemple un neurotransmetteur, les récepteurs liés aux protéines G, modulent les propriétés des canaux ioniques. Ils activent alors une protéine G située du côté cytoplasmique de la membrane qui va convertir puis amplifier le signal. Dans le chapitre suivant, nous allons voir plus en détail les modes de fonctionnement d'une de ces protéines, le récepteur  $GABA_B$ .

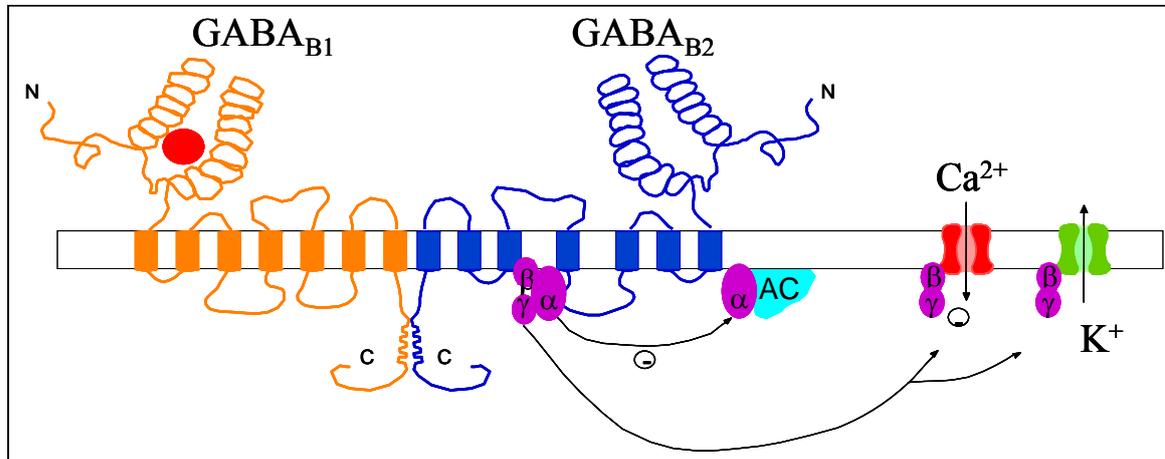


3 : représentation schématique de la membrane plasmique et de ses différents composants. (Tirée de l'encyclopédie Encarta en ligne)

**ii) Le récepteur GABA<sub>B</sub>**

Au sein du système nerveux central, le récepteur GABA<sub>B</sub> est un hétérodimère obligatoire composé de deux sous-unités, GABA<sub>B1</sub> et GABA<sub>B2</sub> (34,35). La sous-unité GABA<sub>B1</sub> porte le signal de rétention RSR et est localisée au sein du réticulum endoplasmique lorsqu'elle est exprimée seule (36). Lorsqu'elle est associée à la sous-unité GABA<sub>B2</sub>, le signal de rétention est masqué et l'hétérodimère fonctionnel ainsi formé est alors amené au niveau de la membrane plasmique. La dimérisation des deux sous-unités de GABA<sub>B</sub> est donc indispensable à la localisation et à la fonction du récepteur (37).

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> ont à la fois un rôle d'inhibition dans la libération pré synaptique de neurotransmetteurs et dans l'excitabilité post synaptique des neurones(38,39). Une conséquence directe de ces inhibitions est un rôle important dans le contrôle de la douleur, en particulier des douleurs chroniques qui résultent d'une exagération de la transmission nociceptives (i.e., liée à une lésion tissulaire) (40). Ce rôle a été confirmé chez des souris mutantes n'exprimant pas le récepteur GABA<sub>B1</sub>, ces dernières présentant des réponses à la douleur très importantes (41). Certains traitements, comme le *baclofen*, permettent de réduire cette réponse à la douleur, mais restent relativement inefficaces sur des animaux douloureux chroniques (42). La compréhension des modes de régulation du récepteur GABA<sub>B</sub> en condition de stimulation nociceptive chronique pourra permettre la découverte de nouveaux agents plus efficaces contre ces douleurs. Une régulation par la diminution de son expression génique a été exclue lors de précédents travaux. Deux solutions peuvent alors expliquer son inactivation : une internalisation du récepteur ou interaction avec un partenaire protéique. L'objectif de notre étude a été de tester le rôle d'un partenaire potentiel, la protéine 14-3-3 $\zeta$ , dont l'interaction avec la sous-unité GABA<sub>B1</sub> a précédemment été démontrée *in vitro* (43). La protéine 14-3-3 $\zeta$  est déjà connue pour sa participation à l'assemblage et au transport d'oligomères hors du réticulum endoplasmique. Il a cependant été démontré que son interaction avec GABA<sub>B1</sub> n'est pas indispensable à sa localisation membranaire. Notre hypothèse était donc que son action se situait au niveau de l'association des sous-unités de GABA<sub>B</sub> et nous avons donc entrepris de tester son action sur les hétérodimères GABA<sub>B1</sub>-GABA<sub>B2</sub> ainsi que les interactions de 14-3-3 $\zeta$  avec ces deux sous unités.



4: Représentation schématique du récepteur GABA<sub>B</sub> et de ses cibles intracellulaires. Le récepteur fonctionnel est un hétérodimère obligatoire fait des sous-unités GABA<sub>B1</sub> (orange) qui lie le ligand et GABA<sub>B2</sub> (bleu) couplé aux protéines Gi/o (violette). N et C représentent respectivement les parties N-(extra) et C-(intra) terminales des sous-unités. α, β, γ sont les sous-unités de la protéine G. Les cibles intracellulaires sont l'adénylate cyclase (AC en turquoise), les canaux calciques (en rouge) et les canaux potassiques (en vert). (-) et (+) représentent les régulations exercées par le récepteur GABA<sub>B</sub>, respectivement inhibition et activation.

*L'objet de cette étude est donc l'analyse des interactions moléculaires dans deux compartiments cellulaires très différents à savoir le noyau et la membrane plasmique. L'étude du récepteur GABA<sub>B</sub> nécessite de plus l'utilisation de cellules très particulières, les neurones. De par les différences entre ces deux études, des stratégies de mesures des interactions adaptées devront être mises en œuvre pour chacune de ces deux grandes questions. Au cours de ce manuscrit, nous allons développer les différentes approches possibles permettant d'aborder ces questions ainsi que les avantages et inconvénients associés à chacune. Pour ce faire, nous nous appuyerons sur une approche tout d'abord instrumentale, que ce soit au niveau de la conception de systèmes d'acquisition dédiés ou à celui de la caractérisation de ces systèmes. Nous étudierons également en détail les modes d'interprétations possibles des données expérimentales ainsi obtenues ainsi que la possibilité de coupler différents types de données, chacun permettant de renseigner et de compléter les informations fournies par les autres.*

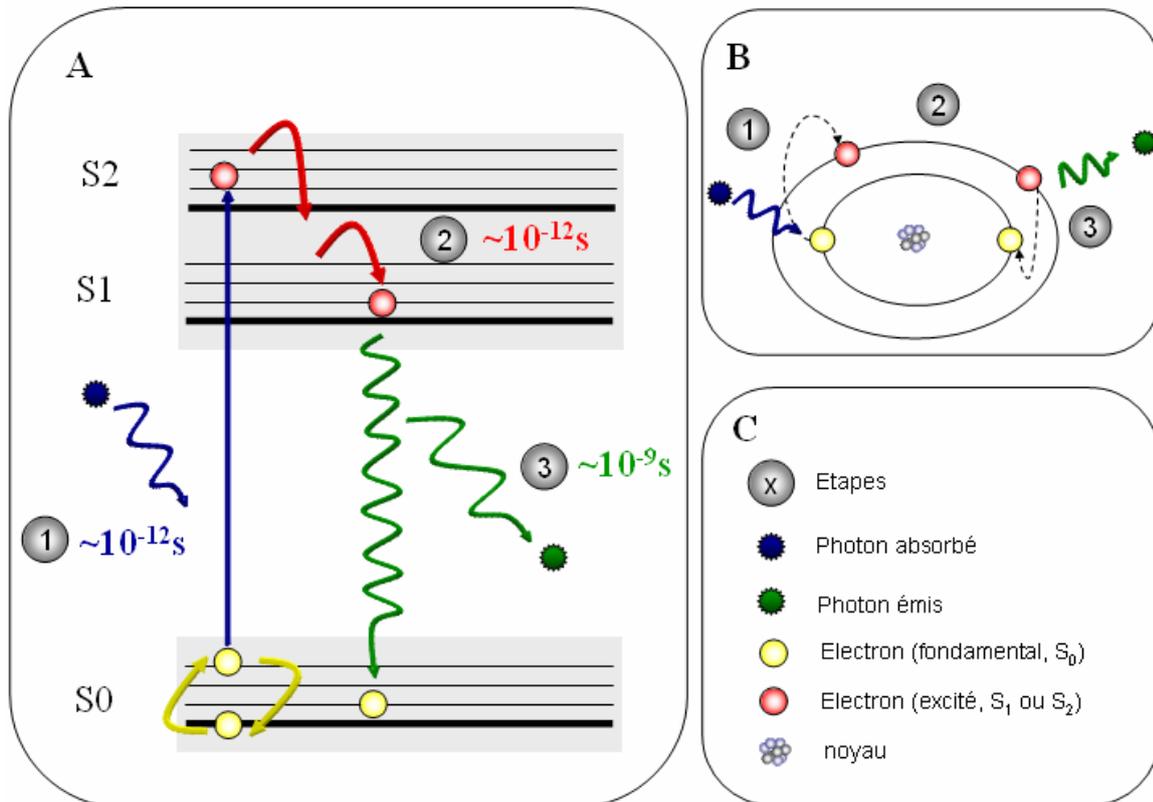
## **Section.2      *Etudes de la dynamique des interactions moléculaires.***

*Différentes techniques existent pour étudier les interactions moléculaires, aussi bien in vitro qu'in vivo, par des techniques physico-chimiques ou microscopiques. L'émergence des protéines GFP, popularisées dans les années 1990 par Roger Tsien (5,44), a grandement participé à l'essor de ces dernières. Chacune ayant ses avantages et inconvénients, nous allons citer certaines de ces méthodes utilisées en microscopie afin d'expliquer pourquoi notre choix s'est porté sur les techniques de mesures de FRET par comptage de photons uniques corrélés dans le temps ou TCSPC.*

## a La fluorescence

### i) Principe.

La fluorescence est un outil précieux pour l'étude du vivant de par la faible invasivité et la spécificité de marquage qu'elle permet d'obtenir. La première observation empirique de la fluorescence réalisée sur la quinine en 1845 par Sir John Frederick William Herschel (45) n'a pu être expliquée avec les connaissances scientifiques de l'époque. De nos jours, les phénomènes photophysiques à l'œuvre sont beaucoup mieux connus. Pour émettre de la fluorescence, une molécule doit posséder au moins un électron délocalisé. Lorsque cette molécule absorbe un photon, elle passe de l'état électronique fondamental à un état électronique excité. La fluorescence est un des modes permettant de revenir à l'état fondamental par l'émission d'un photon. Perrin et Jablonski ont proposé une représentation des différents niveaux énergétiques et des sauts entre ces niveaux associés aux phénomènes de fluorescence. Un diagramme de Perrin-Jablonski typique est présenté figure 5. Les sauts énergétiques entre les états singulets  $S_0$  (l'état fondamental),  $S_1$  et  $S_2$  (états excités) sont



5: diagramme de Perrin-Jablonski représentant la phase d'excitation (1), de relaxation vibrationnelle (2) et de désexcitation accompagnée de l'émission d'un photon de fluorescence (3).

A : D'un point de vue énergétique

B : D'un point de vue électronique

C : Légende.

quantiques, mais il existe différents niveaux vibrationnels entre chacun de ces états. La fluorescence correspond à un saut énergétique de l'état S1 à un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental.

Il existe une grande diversité de molécules fluorescentes. Le choix d'une molécule pour une expérience donnée sera défini selon trois grands critères :

- Son efficacité en tant que molécule fluorescente
- Les propriétés de la fluorescence émise
- Sa sensibilité quant à son environnement

Nous allons donc brièvement passer en revue ces différents critères.

### ***(1) Efficacité des sondes fluorescentes***

Le phénomène de fluorescence passe par l'absorption d'un ou plusieurs photons suivie de l'émission d'un photon d'énergie inférieure. La première caractéristique d'un fluorophore est donc sa capacité à absorber un photon. Elle est définie par le coefficient d'absorption molaire,  $\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ), qui relie, pour une longueur d'onde donnée, la quantité de lumière absorbée à la concentration de fluorophores en solution.

Une fois que la molécule a absorbé l'énergie d'un photon incident et quelle passe dans un état excité, différents modes de désexcitation sont possibles. Parmi ceux-ci, on peut citer une transformation photochimique, un changement de conformation, une conversion interne, l'émission d'un électron ou d'un proton, ou un transfert d'énergie qui pourra être radiatif ou non (46). Comme nous le voyons, le phénomène de fluorescence n'est qu'un des nombreux modes de désexcitation possible. Un fluorophore sera donc caractérisé par son rendement quantique qui définit l'efficacité relative de la fluorescence par rapport aux autres voies de désexcitation. Il est exprimé par  $\Phi$ , le ratio entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

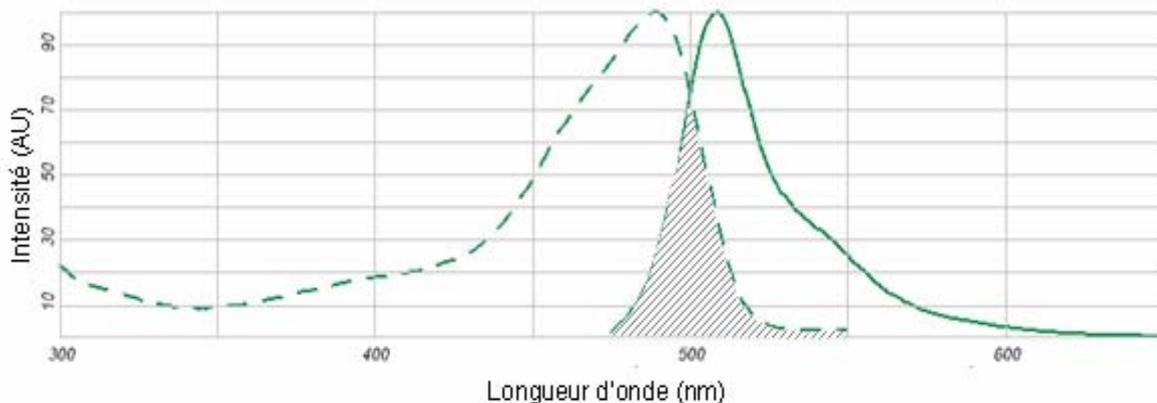
Enfin, parmi les modes de désexcitation possibles, nous avons mentionné la possibilité d'obtenir des réactions photochimiques. Parmi celles-ci, la réaction avec l'oxygène conduisant à la formation de radicaux libres fera perdre au fluorophore sa capacité à émettre des photons. Au fur et à mesure de l'excitation d'un ensemble de fluorophores, une proportion de plus en plus grande sera photoblanchie et ne sera donc plus observable.

Un fluorophore idéal aura donc une forte capacité à absorber puis à réémettre des photons tout en restant stable au cours du temps.

## (2) Propriété de la fluorescence émise

Deux grandes caractéristiques de la fluorescence peuvent être déduites du diagramme de Perrin-Jablonski et pourront être utilisées pour observer de façon spécifique un fluorophore :

- Une partie de l'énergie reçue par le fluorophore sera dissipée dans les états vibrationnels intermédiaires de l'état excité. la longueur d'onde étant inversement proportionnelle à l'énergie, le spectre d'émission aura toujours une longueur d'onde supérieure au spectre d'excitation. Ce décalage entre le maximum de la première bande d'absorption et le maximum d'émission est appelé décalage de Stokes. En regardant précisément les spectres de fluorophores (figure 6), on remarque cependant un chevauchement entre les spectres d'excitation et d'émission de la majorité des fluorophores. La différence d'énergie provient de la chaleur ambiante qui permet à une molécule dans l'état  $S_0$  d'être dans un état vibrationnel excité. L'énergie nécessaire pour passer à l'état excité sera donc plus faible, ce qui explique ce



6: spectre d'absorption (pointillé) et d'émission (trait plein) de la E-GFP. La zone de chevauchement entre les deux spectres est hachurée (modifié de <http://probes.invitrogen.com/>)

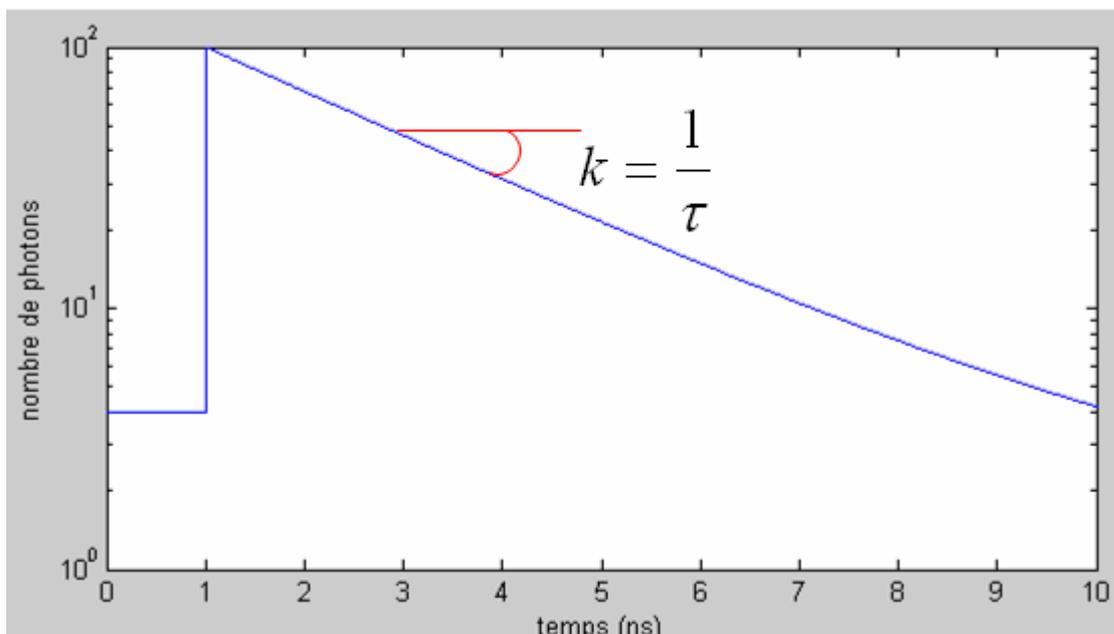
chevauchement(46). Il est à noter que l'énergie pour passer d'un état singulet à un autre est très supérieure à celle nécessaire à un changement d'état vibrationnel. La probabilité que l'échauffement de l'échantillon entraîne la molécule dans un état excité est donc pratiquement nulle. (Le calcul de ces probabilités de changement d'état peut être obtenu grâce à la loi de Boltzmann)

- Le temps entre l'excitation d'un fluorophore et l'émission d'un photon sera égal à la somme de trois temps :
- passage de  $S_0$  à  $S_1$ , de l'ordre de  $10^{-12}$  s
  - temps de résidence dans les états excités, de l'ordre de  $10^{-9}$  s
  - retour à l'état fondamental et émission d'un photon, de l'ordre de  $10^{-12}$  s

Le processus complet d'émission d'un photon sera donc de l'ordre de la nanoseconde pour les fluorophores usuels. Après excitation, chaque photon aura un temps d'émission qui va suivre une loi de probabilité de type exponentielle. Après observation d'un grand nombre de temps d'émission de photons, on obtient une courbe de déclin de fluorescence correspondant à cette loi de probabilité d'émission. La pente de cette courbe est alors inversement proportionnelle à une autre propriété caractéristique d'un fluorophore : le temps de vie de fluorescence. Cette propriété peut être considérée comme indépendante de la concentration au regard des niveaux d'expression de fluorophores raisonnablement utilisables en cellule. Elle sera par contre influencée par l'environnement local et la température du fluorophore ainsi que par les modes de désexcitation dont il dispose. On aura alors

$$k = k_r + k_{nr} \quad \text{Eq. 1}$$

Avec  $k$  cinétique de déclin moyenne ;  $k_r$  la cinétique de déclin radiative (fluorescence),  $k_{nr}$  la cinétique de déclin non radiative (transfert d'énergie.)



7: représentation semi logarithmique d'une courbe typique de déclin de fluorescence pour une espèce mono-exponentielle. Le temps de vie de fluorescence ( $\tau$ ) peut être calculé à partir de la pente ( $k$ ) de cette courbe.

Le temps de vie de fluorescence pourra être calculé en ajustant la courbe de déclin par la formule suivante :

$$I(t) = of + \sum_{i=1}^n a_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad \text{Eq. 2}$$

*Avec : **I** l'intensité ; **of** le niveau de bruit **t** le temps ; **n** le nombre d'espèces exponentielles ; **a** la proportion de l'espèce et  **$\tau$**  le temps de vie de l'espèce.*

Chacune de ces propriétés est caractéristique du fluorophore étudié. Une molécule fluorescente pourra donc être identifiée en observant son spectre d'absorption ou d'émission. La cinétique d'émission des photons, dont le temps de vie de fluorescence est extrait, est une autre méthode d'identification de ces molécules.

### ***(3) Sensibilité à l'environnement.***

Les propriétés que nous avons passées en revue ne sont pas des propriétés absolues mais dépendent du milieu dans lequel les fluorophores sont observés et de la température à laquelle sont réalisées nos expériences. En particulier, certaines sondes sont particulièrement sensibles au pH ou à la présence d'ions comme le chlore ou le sodium ; ces propriétés d'émission permettent d'estimer l'environnement local.

Nos expériences se situant dans le contexte cellulaire et le plus souvent à 37°C, les fluorophores que nous allons utiliser doivent être stables à cette température. Leurs propriétés doivent également être indépendantes des différents environnements que la protéine risque de rencontrer en fonction de sa localisation dans la cellule.

### ***ii) Les molécules fluorescentes endogènes***

De nombreuses molécules fluorescentes sont présentes de façon endogène dans la majorité des cellules. Parmi celles-ci, les plus couramment rencontrées sont (47) :

- La famille des flavines, coenzymes dont le maximum d'émission ( $\lambda_m$ ) se situe entre 530nm et 560 nm. Leur temps de vie moyen ( $\tau_m$ ) est situé entre 200 et 2885 ps(48,49)
- La nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) ou NAD(P)H, autre coenzyme dont la  $\lambda_m$  se situe entre 440nm et 460 nm et le  $\tau_m$  entre 400 et 2800 ps. Dans les cellules, la fluorescence de ces dernières est 10 à 100 fois supérieure à celle des flavines.(49,50)
- Les lipofuscines, un pigment dont la quantité augmente avec l'âge et qui se trouve dans le cytoplasme des cellules post mitotiques. Sa  $\lambda_m$  est comprise entre 420 et 560 nm et son  $\tau_m$  peut atteindre 12000 ps.(49,51)
- L'élastine et le collagène, protéines de structure présentant une fluorescence verte à jaune dont le  $\tau_m$  est compris entre 1500 et 2500 ps(49,52)

Ces molécules peuvent donc être étudiées sans aucune modification de la biologie de la cellule. Cette autofluorescence devient par contre un handicap dans le cas d'étude de marquages exogènes. En effet, l'autofluorescence cellulaire couvre à la fois un large spectre et une vaste gamme de temps de vie de fluorescence. Un soin particulier devra donc être appliqué, sans quoi, elle entraînera un niveau de fluorescence difficile à séparer du marquage.

### ***iii) Les molécules fluorescentes exogènes***

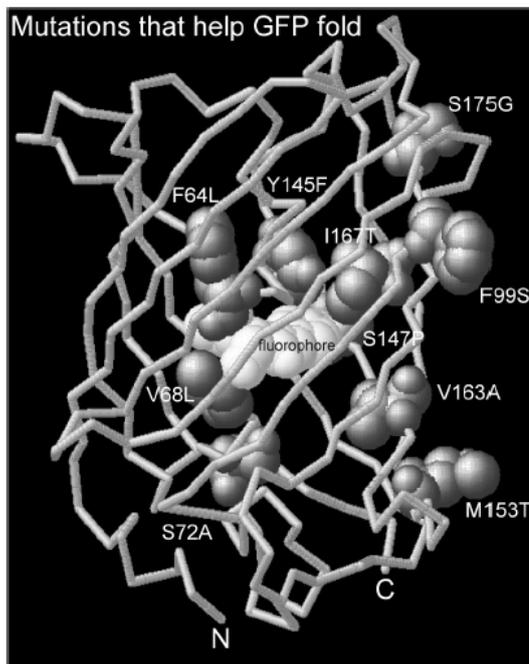
L'autofluorescence cellulaire permet d'étudier un nombre restreint de protéines. L'utilisation d'un marquage exogène donne accès à des informations beaucoup plus variées. Différentes stratégies permettent de réaliser ce type de marquage. Certains fluorophores se dispersent dans la cellule ou se localisent naturellement dans des compartiments particuliers. C'est le cas du Hoechst 33342 qui marque spécifiquement les

séquences A-T de l'ADN. Une autre solution pour obtenir un marquage spécifique consiste à lier une molécule fluorescente à une protéine dont le comportement est connu. En particulier, l'utilisation d'anticorps marqués (ou d'un couple anticorps primaire, anticorps secondaire marqué) permet de localiser une protéine donnée de façon très spécifique.

Ces types de marquages offrent une grande spécificité de détection. Malheureusement, les protocoles permettant l'entrée de ces molécules dans la cellule sont le plus souvent très invasifs et sont donc rarement compatibles avec les études dans le vivant.

#### *iv) Les protéines de la famille des GFP*

La « Green Fluorescent Protein » ou GFP est une protéine fluorescente naturellement produite par la méduse *Aequoria Victoria*. Cette protéine peut donc être considérée comme endogène dans ce cas précis. Osamu Shimomura fut la première personne à isoler cette molécule et à déterminer de quelle partie de la GFP provenait la fluorescence.



8: structure cristalline de la GFP sur laquelle sont représentés les sites les plus importants pour favoriser son bon repliement à 37°C. la lecture de cette information est de la forme AA sauvage – position – AA de remplacement. Cette figure est tirée du travail de l'équipe de Roger Tsien (4,5)

Actuellement, son utilisation principale consiste à lier l'ADN de la GFP à celui d'une protéine d'intérêt puis d'introduire par transfection le plasmide ainsi formé dans les cellules étudiées. La cellule va alors produire la protéine liée à la GFP. Le marquage ainsi obtenu est spécifique et peu invasif. Depuis l'apparition de cette technique, de nombreux variants de cette protéine ont été découverts, en particulier grâce au travail de Roger Tsien et de son équipe, et ont permis l'optimisation de ces protéines fluorescentes.

Comme nous l'avons vu dans la figure précédente, des mutations ponctuelles permettent d'améliorer la stabilité de la protéine GFP sauvage (ou GFPwt) à 37°C, température la plus couramment utilisée en biologie. La GFPwt présente également une brillance assez faible, une vitesse de maturation lente et un niveau d'expression faible. Dans la eGFP (pour enhanced GFP), deux mutations ponctuelles de la GFPwt : S65T et F64L améliorent grandement ces caractéristiques et la eGFP a donc remplacé la GFPwt dans la majorité des applications actuelles.

La connaissance de la séquence ADN de la protéine GFPwt a également permis la création de nombreux variants spectraux. Le large choix de couleurs des variants GFP permet alors le marquage et l'observation simultanée de plusieurs protéines. Lors de nos études, nous utiliserons en particulier les variants CyanFP et YellowFP, qui présentent des caractéristiques spectrales compatibles avec les études de FRET. La protéine CFP présente un déclin de fluorescence multi-exponentiel, ce qui ajoute à la complexité de l'interprétation des mesures de FRET par les techniques de FLIM (chapitre I.2.c). Nous avons donc également utilisé un variant de la CFP, la CeruleanFP (53) qui présente un mode de déclin mono-exponentiel. Plus récemment, une protéine extraite du corail *Discocoma*, la « red fluorescent protein » (RFP ou DsRed) et ses variants, a permis d'étendre le spectre d'observation des protéines transfectées. Ces dernières ayant une tendance naturelle à tétramériser, elle est le plus souvent remplacée par un de ces variants monomériques comme la mRFP1 ou la mCherry. Ces dernières sont utilisées comme accepteur lors d'expériences de FRET utilisant l'eGFP comme donneur.



9: spectre d'émission (gauche) et image de fluorescence (droite) de différents variants de la RFP. De gauche à droite mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, et mCherry (figure tirée de(7))

Enfin, certaines protéines GFP peuvent être utilisées en tant qu'outils pour les études de dynamiques et d'interactions moléculaires. Parmi celles-ci, on peut citer les protéines photoactivables ou photoconvertibles comme la PA-GFP (54) (pour photoactivable GFP). Ces dernières voient leurs spectres d'émission profondément modifiés après irradiation à une

longueur d'onde spécifique. Dans le cas de la PA-GFP, une irradiation à 400nm augmentera la fluorescence émise d'un facteur 100 lors d'une excitation réalisée à 504nm. Ce type de modification permet, après activation de la PA-GFP, d'observer les mouvements de la protéine marquée au sein de la cellule, et par là même de déduire les modes de déplacement impliqués (i.e. diffusion, transport actif, passif.)

D'autres variants GFP permettent le suivi d'interactions moléculaires grâce à la technique de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complémentation) Dans ce cas, chacune des protéines d'intérêt est fusionnée à une moitié d'un variant de la GFP. Ces deux moitiés ne pouvant émettre de la fluorescence qu'une fois réunies, l'apparition de fluorescence permettra de localiser les zones d'interactions entre les protéines d'intérêt. Cette technique présente l'avantage d'être utilisable avec un simple microscope à épifluorescence et de permettre l'observation simultanée de différents couples d'interactions. Son principal inconvénient tient au fait que la reformation de la protéine fluorescente est un processus irréversible qui stabilisera les protéines d'intérêt en interaction. Cette stabilisation exclut donc toute analyse dynamique des interactions et peut également provoquer un fort dérèglement de l'activité de la cellule et une forte invasivité. De plus, les deux parties d'une GFP présentent une affinité forte l'une pour l'autre une concentration trop importante de fluorophores pourra entraîner une reformation non spécifique de la protéine tronquée. L'utilisation des BiFC permet donc une étude préliminaire des interactions dans la cellule mais des études plus poussées nécessiteront des approches comme les études de FRET sur lesquelles nous reviendrons tout au long de ce manuscrit.

#### ***v) Les boîtes quantiques ou « quantum dots » (Qdots)***

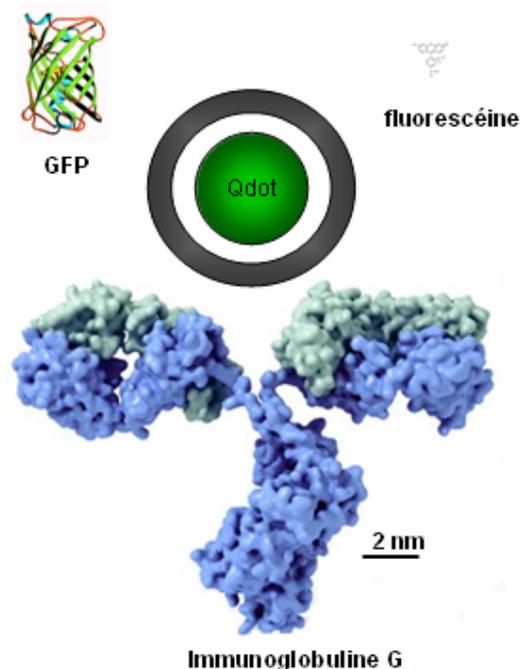
Les Qdots sont des nanocristaux semi-conducteurs d'une taille de 1 à 20 nm. Ils sont composés de quelques centaines à quelques dizaines de milliers d'atomes de matériel semi-conducteur ; classiquement un mélange de cadmium avec du sélénium ou du tellurium, forme le cœur du Qdot. Ce cœur est recouvert d'une enveloppe d'un autre semi-conducteur, comme le sulfide de zinc, qui permet d'améliorer les propriétés optiques du cœur. Cet ensemble est ensuite recouvert d'une couche de polymère, rendant la particule biocompatible et permettant la greffe de biomolécules à sa surface.

Les Qdot se comportent comme un puits de potentiel qui confine les électrons dans une région de l'ordre de la longueur d'onde des électrons. Ce confinement confère aux électrons du nanocristal des niveaux d'énergie discrets, de façon similaire à un atome. Ces

niveaux d'énergies sont contrôlés par les matériaux et par la taille du Qdot. Ces niveaux d'énergies varient comme le carré de la longueur de confinement, un petit nanocrystal entraînera une plus grande différence de niveau d'énergie, et donc, une plus grande énergie d'émission (entraînant une plus faible longueur d'onde)(55).

Ces fluorophores présentent de nombreux avantages par rapport aux fluorophores classiques. Leur rendement quantique très élevé et leur photostabilité remarquable permettent de suivre la même molécule fluorescente pendant plusieurs dizaines de minutes (un fluorophore classique sera photoblanchi après quelques secondes)(47). L'utilisation de Qdots de tailles différentes offre la possibilité d'obtenir des spectres d'émission distincts avec une seule source d'excitation. La largeur du spectre d'émission dépend directement de la dispersion de la taille des Qdots, et il est actuellement possible d'obtenir des spectres présentant une largeur à mi-hauteur de 20nm et un profil gaussien. Enfin, une propriété intéressante est le temps de vie de ces molécules qui est beaucoup plus long que celui des fluorophores classiques (plusieurs dizaines de nanosecondes pour les Qdots contre quelques nanosecondes pour les fluorophores usuels). Ces propriétés spectrales et de temps de vie font des Qdots un outil précieux permettant des marquages multiples dans différents espaces de visualisation de la fluorescence.

Le principal inconvénient de ces molécules est leur taille qui rend le protocole d'intégration dans les cellules assez complexe.



*10: schéma d'échelle de différentes molécules. adapté de (6-8)*

## b La microscopie de fluorescence pour l'étude des interactions.

### i) Microscopie à épifluorescence classique.

Le microscope dans sa forme la plus réduite est constitué d'un simple objectif et d'un oculaire, c'est-à-dire de deux lentilles convergentes.

Ces deux lentilles forment une image très agrandie de l'objet et permettent d'observer des détails fins dans l'échantillon.

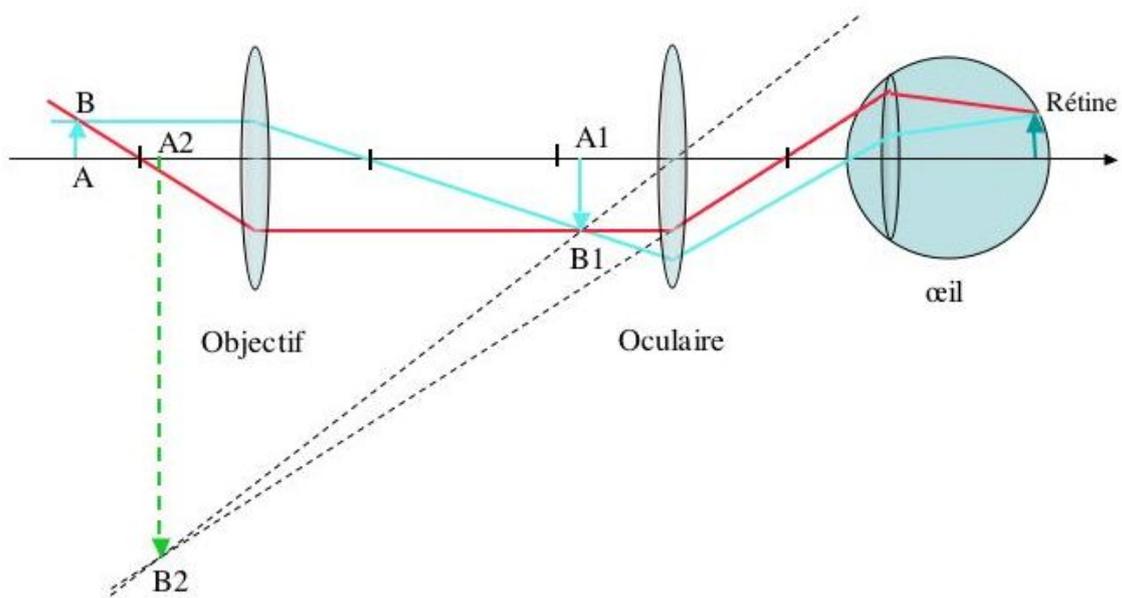


Figure 11: Principe optique du microscope (voir le texte pour plus de détails).

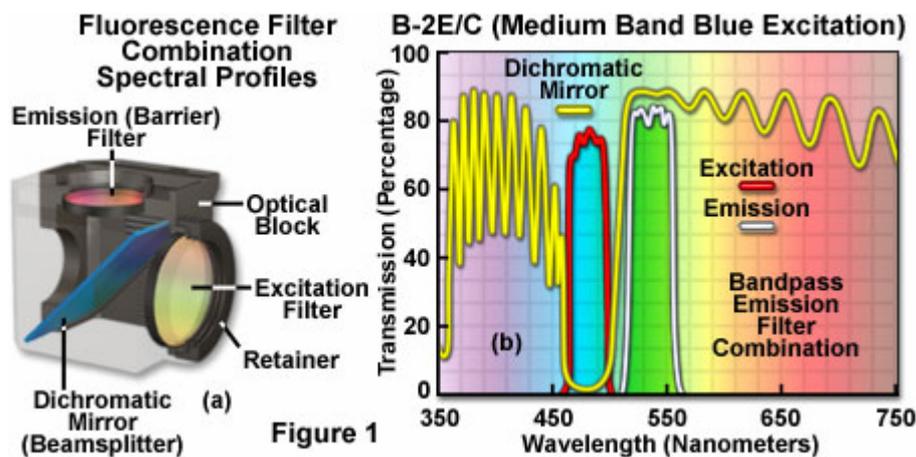
Dans ce schéma simplifié, l'objectif donne de l'objet AB observé une image réelle A1B1 renversée et très agrandie qui joue pour l'oculaire le rôle d'objet réel. L'oculaire donne de cet objet une image virtuelle A2B2 agrandie. Enfin, l'œil forme une image de l'objet A2B2 sur la rétine.

Le grossissement commercial  $G_m$  du microscope, rapport du diamètre apparent de l'image définitive à celui de l'objet observé à l'œil nu à la distance conventionnelle de 250 mm est :

$$G_m = \text{grossissement (oculaire)} \times \text{grossissement (objectif)}$$

Ainsi la puissance et le grossissement du microscope sont égaux aux produits du grandissement de l'objectif et, respectivement, de la puissance et du grossissement de l'oculaire (grossissement final jusqu'à 2000x). Le grandissement de l'objectif et le grossissement de l'oculaire sont habituellement gravés sur les montures de ces éléments.

Un microscope à fluorescence est un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire pour une observation par transmission et une lampe à arc pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité. Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission.



12 : illustration d'un jeu de filtre typiquement utilisé en fluorescence, avec à gauche, le schéma décrivant la position des filtres et à droite les spectres de transmission/réflexion associés. Illustration tirée du site web de la société Nikon (<http://www.microscopyu.com>)

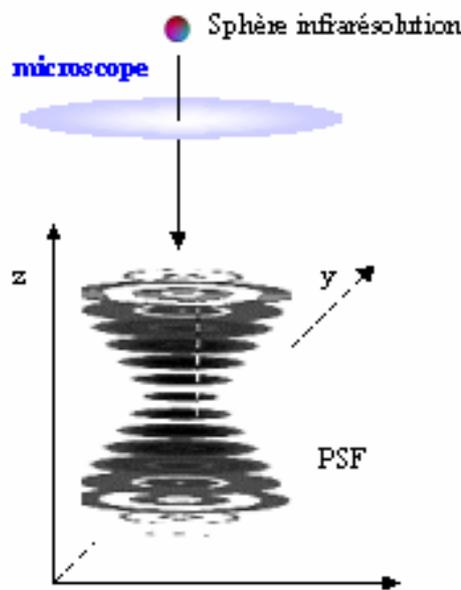
La microscopie à épifluorescence utilise un système d'éclairage et de détection permettant de traiter l'échantillon en une seule fois et sans balayage. Elle conviendra donc parfaitement au suivi de phénomènes biologiques rapides comme les mouvements calciques. Elle entraînera par contre une altération plus rapide des fluorochromes par photoblanchiment ainsi que la libération de radicaux libres et donc des dégradations au niveau cellulaire.

La résolution d'un microscope est une des données les plus importantes. Elle nous permet de déterminer la distance minimale entre deux objets à laquelle il est encore possible de les distinguer. La résolution dépend du grandissement de notre système, mais elle est également limitée par la déformation que subit l'objet observé à travers un système optique.

En effet, comme l'illustre la figure 13, l'image obtenue est, au bruit près, le produit de convolution de l'objet observé par la fonction de propagation du point (PSF pour Point Spread Fonction) de notre système optique.

Cette PSF est définie de la façon suivante : imaginons un objet lumineux assimilé à une source ponctuelle qui soit observé en utilisant un système de lentilles. De par la nature ondulatoire de la lumière on peut dire que la source lumineuse ponctuelle va être dispersée par ce système de lentilles suivant une distribution dans les trois dimensions. La fonction qui décrit cette propagation est appelée PSF (56).

Des techniques de traitement d'image comme la déconvolution 3D permettent, après acquisition des informations des différents points de l'espace, de réaliser une transformation mathématique qui sera la réciproque de celle causée par nos optiques et induisant la déformation de nos images. Des modifications instrumentales, conduisant à la microscopie confocale ou à la microscopie bi-photonique, permettront également de limiter cette déformation.



*Figure 13: déformation  $x$  subie par un objet ponctuel observé par un microscope : la PSF*

**ii) CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy).**

La microscopie confocale a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ, de l'ordre de 600nm. Le principe de ce microscope a été décrit par Marvin Minsky en 1953 mais sa réelle émergence a eu lieu dans les années 1980 avec l'apparition de systèmes commerciaux.

La microscopie confocale (57) suit le même principe que la microscopie à fluorescence précédemment présentée, avec quelques modifications permettant de limiter la taille de la PSF.

L'utilisation d'un sténopé (diaphragme de taille réglable) ou « *pinhole* » va nous permettre d'acquérir de façon sélective l'information provenant du plan de focalisation, c'est ce qui donne à ce type de microscopie son appellation de confocale. Pour simplifier, on peut considérer qu'on réglera le diamètre de ce trou pour qu'il soit égal au diamètre de la largeur à mi-hauteur de la tache de diffraction en x/y ( $\delta_{xy}$ ), soit la distance minimale entre deux points à laquelle on peut les distinguer l'un de l'autre. Cette distance peut être calculée de la façon suivante :

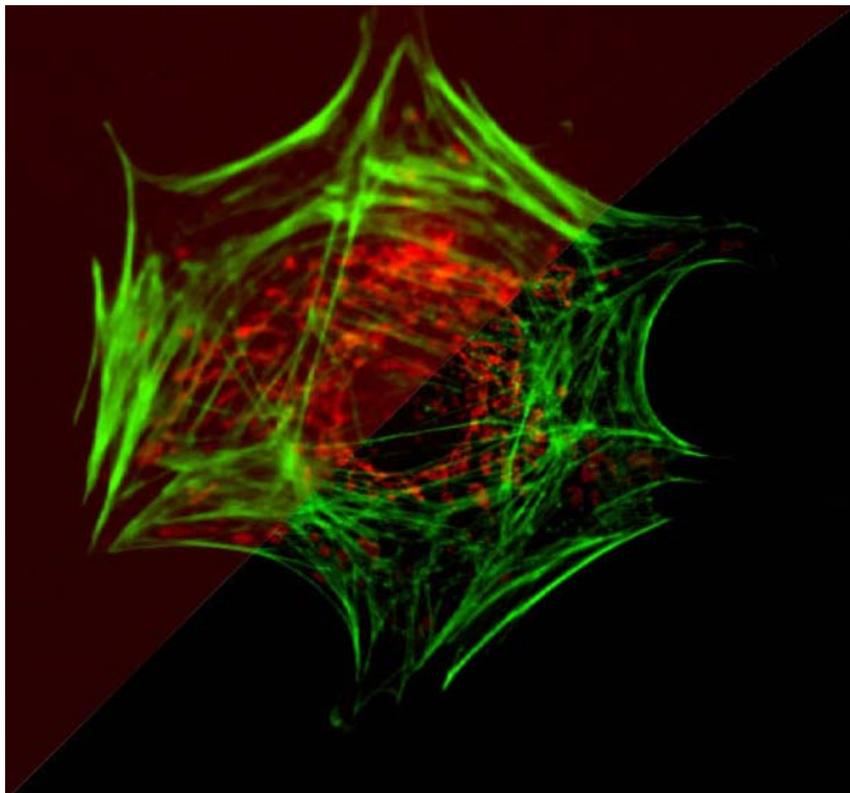
$$\delta_{xy} = \frac{0,61\lambda}{n.\sin\theta} \quad \text{Eq.3}$$

$$\delta_z = \frac{2\lambda}{n.(\sin\theta)^2} \quad \text{Eq.4}$$

$\lambda$  : La longueur d'onde d'émission,  $n$  : l'indice de réfraction du milieu d'immersion,  $\theta$  : l'angle du demi cône de lumière capté par l'objectif.

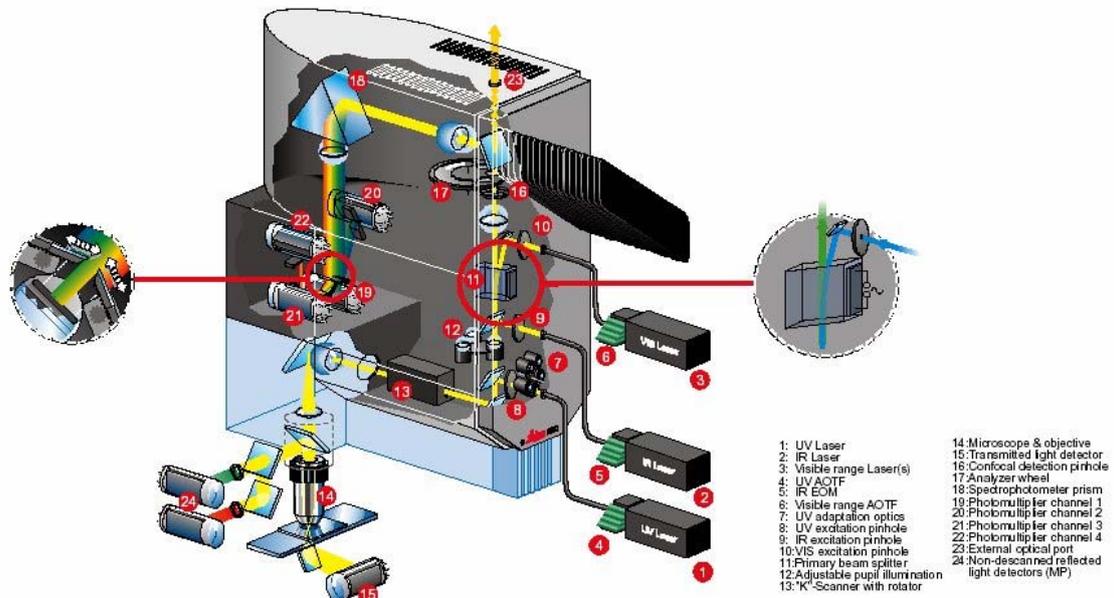
De véritables coupes optiques pourront être acquises. En effet, l'épaisseur de ces coupes est égale à  $\delta_z$  correspondant à la résolution axiale optimale, obtenue lorsque le diamètre du *pinhole* est égal à  $\delta_{xy}$ . Notre image ne contient alors plus que les informations provenant du plan de focalisation (figure 14). Il est alors possible, en réalisant des coupes optiques et de reconstruire notre objet en 3D grâce à des techniques d'interpolation. Le *pinhole* arrêtant l'information des plans non focalisés, le niveau de fluorescence observé sera plus faible. Les images auront donc un rapport signal sur bruit beaucoup plus faible (généralement compris entre 10 et 30 alors qu'il est classiquement supérieur à 40 en vidéomicroscopie)

Au niveau du système d'acquisition, deux éléments importants sont à noter : la source de lumière excitatrice sera constituée de lasers possédant des raies d'excitation compatibles avec les fluorophores. Des détecteurs de type PMT (Tube Photo-Multiplicateur) sont ajoutés, permettant de réaliser des acquisitions point par point en balayant l'image. Cette technique augmente considérablement le temps d'acquisition des images. En contrepartie, elle permet de n'éclairer que la zone choisie des échantillons ce qui, dans des conditions classiques, évite la destruction des molécules marquées sur une grande surface de l'échantillon. Le laser traversant entièrement les cellules, entraînera par contre une inactivation de la fluorescence des molécules marquées présentes au dessus et au dessous du plan de focalisation. La puissance des lasers étant modulable, il est également possible d'éclairer de façon très intense certaines zones d'intérêt pour photoblanchir spécifiquement les fluorophores présents. Cette technique est particulièrement utile dans les études de dynamique moléculaire qui pourront alors être réalisées par des techniques de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)



*Figure 14: comparaison entre une image obtenue par microscopie classique (partie gauche) et par microscopie confocale (partie droite).*

Le schéma optique complet du système d'excitation et de balayage d'un microscope confocal de type CLSM, le Leica SP2, est présenté figure suivante :

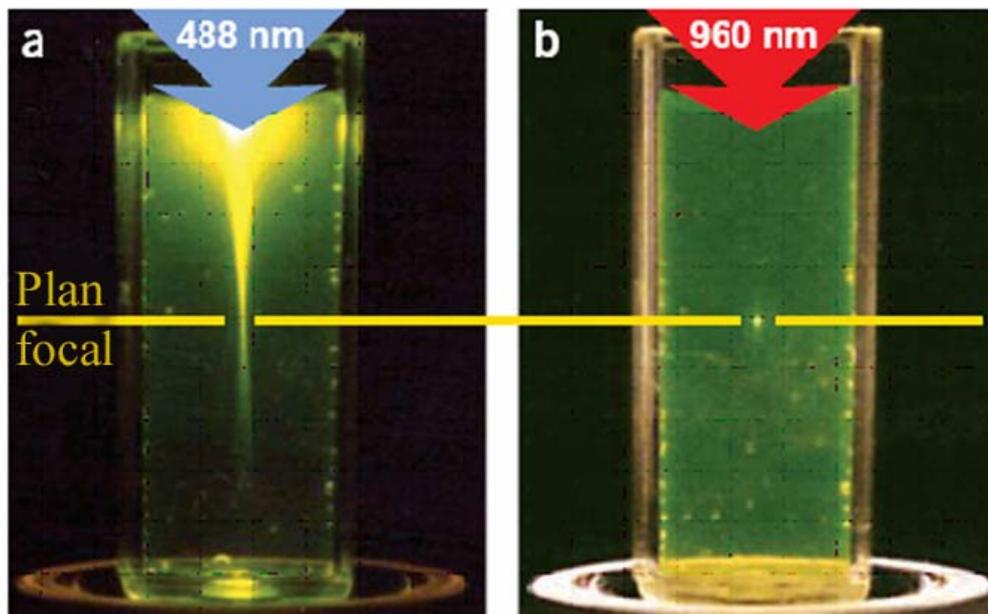


15: schéma détaillé de la tête de balayage du microscope Leica SP2 (tirée de la documentation de ce même microscope)

**iii) L'excitation à deux photons.**

Maria Goeppert-Mayer, prix Nobel de physique en 1963, a démontré au cours de sa thèse que si un photon ne possède pas une énergie suffisante pour induire une transition électronique de l'état  $S_0$  à un état excité  $S_1$  ou  $S_2$ , l'arrivée d'un autre photon possédant l'énergie manquante dans un intervalle spatio-temporel très court, permettra d'amener la molécule fluorescente dans son état excité.

Cette propriété est la base d'une autre technique pour réaliser des coupes optiques qui utilise un système relativement similaire au dispositif précédent mais qui remplace la source laser classique par un laser pulsé, de préférence ajustable en longueur d'onde. Pour les fluorophores que nous allons étudier, les spectres d'excitation se situant entre 400 et 500 nm, en utilisant une source pulsée ajustable entre 750 nm et 1050 nm, un fluorophore ne recevra assez d'énergie pour passer à l'état excité que s'il reçoit deux photons dans un intervalle de temps équivalent à celui des fluctuations d'énergie moléculaire à l'échelle des énergies de photon, comme défini par le principe d'incertitude d'Heisenberg, i.e.  $10^{-16}$ s (58). La probabilité d'un tel événement, dans le cas d'un laser femtoseconde comme le nôtre, est globalement très faible, cette dernière requérant une densité de flux de photon de l'ordre de  $10^{31}$  photons.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Cette probabilité augmente énormément dans les zones à forte concentration de photons, c'est à dire au niveau du point de focalisation. On obtiendra donc une excitation exclusive du point de focalisation (figure 16) tout en collectant la totalité des photons émis par le fluorophore, grâce à l'absence de *pinhole*. Cette technique présente donc l'avantage de n'exciter que la zone d'intérêt dans les trois dimensions, limitant ainsi le photoblanchiment quand celui-ci n'est pas souhaité. Le laser étant pulsé, il sera également possible d'accéder à d'autres propriétés des fluorophores comme la durée de vie, valeur extraite du temps moyen que met un photon à être émis après excitation du fluorophore. Cette valeur est caractéristique des fluorophores étudiés. N'étant pas dépendante de la concentration, elle permettra de visualiser simultanément deux molécules marquées dont les concentrations sont très différentes. L'environnement local faisant varier cette durée de vie, on pourra déduire des éléments comme le pH d'un compartiment cellulaire ou la présence d'autres molécules marquées dans un environnement très proche, de l'ordre d'une quarantaine d'Angström.

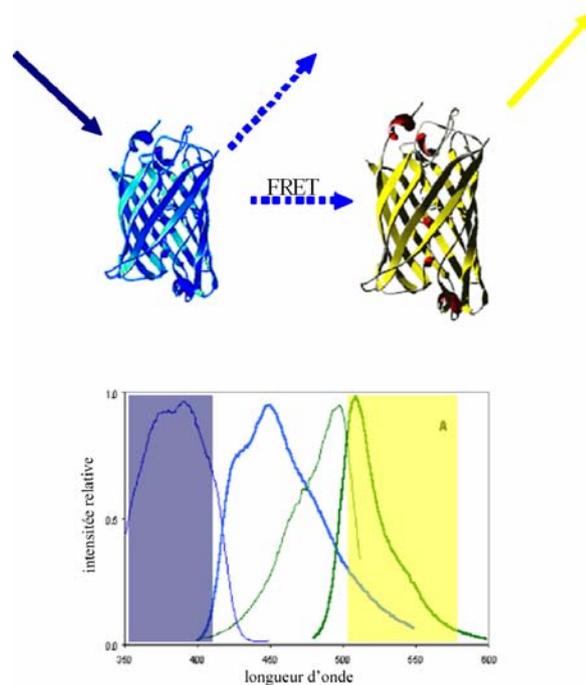


*Figure 16 : Localisations de la fluorescence émise après excitation à un ou deux photons.  
a, excitation à un photon de la fluorescéine obtenue par la focalisation d'une source à 488 nm par un objectif d'ouverture numérique (0.16)  
b, le même dispositif a été utilisé mais la source est un laser femtoseconde à 960nm induisant une excitation biphotonique de la fluorescéine.  
Cette figure est tirée des travaux de W.W.Web (2)*

## c Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

### i) Théorie

Comme nous l'avons vu au chapitre I.2.a, chaque fluorophore est caractérisé par un spectre d'excitation et par un spectre d'émission. Si on a recouvrement entre le spectre d'émission d'un fluorophore appelé donneur et celui d'excitation d'un autre appelé accepteur on pourra avoir un transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur ou FRET (figure 17)



17: représentation schématique du processus de FRET et spectre de fluorescence associés pour le couple CFP/YFP

L'efficacité de ce transfert est définie par l'équation suivante :

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Eq. 5}$$

Avec  $E$  l'efficacité de FRET ;  $F$  l'intensité et  $\tau$  le temps de vie de la fluorescence du donneur respectivement en présence ( $DA$ ) ou absence ( $D$ ) de l'accepteur ;  $r$  la distance entre les deux fluorochromes ;  $R_0$  la distance de demi transfert qui est caractéristique d'un couple de fluorophores donné et dont l'expression est:

$$R_0 = \left\{ \frac{9000 (\ln 10) K^2 Q_d J}{128 \pi^5 n^4 N_{av}} \right\}^{1/6} \quad \text{Eq.6}$$

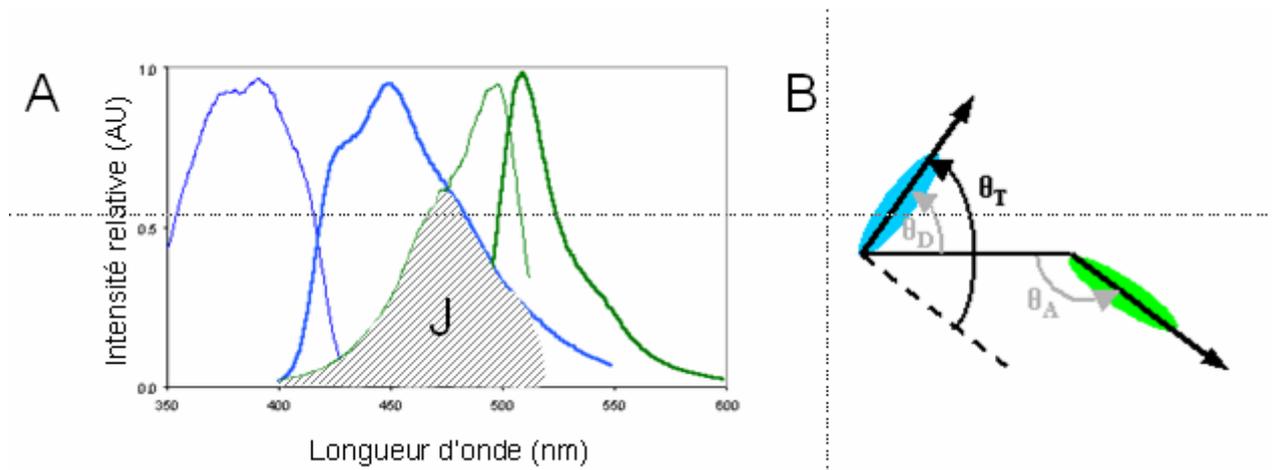
$Q_d$  : le rendement quantique du donneur ;  $n$  : l'indice de réfraction du milieu (considéré comme étant de 1.4 pour les protéines) ;  $N_{av}$  : le nombre d'Avogadro ( $N_{av} = 6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ) ;  $J$  : la fonction intégrale exprimant le taux de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur et  $K$  : le facteur d'orientation.

Dans le cas de deux molécules ayant une liberté de mouvement équivalente dans toutes les directions, le facteur d'orientation est défini par l'équation suivante :

$$K^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cdot \cos \theta_A)^2 \quad \text{Eq. 7}$$

$\theta_T$  : l'angle entre le moment de transition d'émission du donneur et le moment de transition d'absorption de l'accepteur ;  $\theta_D$  et  $\theta_A$  : les angles entre les lignes de connections donneur/accepteur et les moments de transitions respectivement d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.

La figure suivante donne une explication schématique des facteurs J et K de l'équation.



18: facteur entrant en jeu dans le calcul de l'efficacité de FRET.

A : spectre d'excitation et d'émission d'un couple de FRET. La zone marquée J représente le taux de recouvrement de l'équation 6.

B : représentation schématique des angles de l'équation 7.

Le bleu représente le donneur et le vert, l'accepteur

Un événement de FRET va se traduire par des modifications des caractéristiques de la fluorescence émise par les différents fluorophores présents:

- Les propriétés spectrales du mélange de fluorophores seront altérées de par la diminution de l'émission du donneur et l'augmentation de celle de l'accepteur.
- Ce transfert constitue également un mode de désexcitation supplémentaire pour le donneur. Cela implique l'apparition d'un nouveau facteur  $k$  de l'équation 1 et donc une diminution globale du temps de vie moyen.

Il en découle deux grandes catégories de techniques de mesure de FRET : les premières, basées sur des mesures d'intensité demandent des temps d'acquisition assez courts (quelques dizaines de millisecondes) et sont principalement qualitatives, alors que les mesures de temps de vie de fluorescence, bien que plus précises, nécessiteront des temps d'acquisition beaucoup plus longs (quelques secondes à quelques minutes).

## ***ii) Exemples de méthodes de mesure basées sur l'intensité de fluorescence***

*De nombreuses méthodes existent pour tirer partie des modifications d'intensité de fluorescence dans le cas du FRET. L'article de revue de Elisabeth A Jares-Erijman et Thomas M Jovin (59) offre une très bonne vue d'ensemble de ces techniques. Nous allons ici présenter deux de ces techniques que nous avons testées au laboratoire.*

- FRET par mesure des variations d'intensité de fluorescence de l'accepteur

Une des solutions les plus intuitives pour mesurer le FRET est de calculer le rapport entre les intensités de fluorescence de l'accepteur lorsqu'il est excité à la longueur d'onde d'excitation du donneur et lorsqu'il est excité à sa propre longueur d'onde d'excitation. Les spectres d'excitation étant relativement larges pour les fluorophores adaptés à la biologie, l'accepteur pourra être excité, même sur la raie d'excitation du donneur, mais à un niveau assez faible. La présence d'un fluorophore donneur augmentera cette intensité de façon significative. L'intensité étant proportionnelle à la quantité de fluorophores dans le milieu, on devra s'en affranchir en calculant le rapport précédemment décrit. S'il donne une valeur supérieure à celle de l'accepteur seul, on pourra conclure à un probable transfert d'énergie.

- FRET par photoblanchiment de l'accepteur

Une propriété intéressante des fluorophores qui va être exploitée ici est le photoblanchiment. En effet, quand on expose un fluorophore à une grande quantité d'énergie, il perd ses propriétés de fluorescence. De plus, il est possible de photoblanchir sélectivement l'un des deux fluorophores, si leurs spectres d'excitation sont bien séparés.

Lors de phénomènes de FRET, le donneur va transférer une partie de son énergie pour exciter l'accepteur de façon non radiative. En détruisant sélectivement cet accepteur, on aura donc augmentation de l'intensité du donneur et diminution de l'intensité de l'accepteur. Dans cette technique dite de pB-FRET, la mesure de l'intensité d'émission du donneur avant et après photoblanchiment de l'accepteur nous donnera une estimation de ce transfert d'énergie.

***iii) Méthode de mesure basée sur la polarisation de fluorescence : déclin d'anisotropie de fluorescence :***

En utilisant une lumière d'excitation polarisée, tel un laser, on excitera spécifiquement les chromophores dont le moment de transition d'absorption est parallèle à la direction du champ électrique de la lumière incidente. La lumière de fluorescence est alors polarisée selon la direction du moment de transition de l'émission. La mesure de la dépolarisation de fluorescence au cours du temps nous renseigne sur la vitesse de rotation de la molécule. En effet, si un photon est émis immédiatement après excitation, la réorientation de la molécule sera nulle et aucune dépolarisation ne sera observée. Ce niveau de dépolarisation augmentera en fonction de la relation entre le temps d'émission des photons et la vitesse de rotation de la molécule observée (60). Un phénomène de FRET induira une dépolarisation accélérée de la lumière lors d'un transfert entre deux fluorophores d'orientation isotrope et non corrélée ; la lumière émise par le second fluorophore n'étant plus corrélée avec l'orientation de la lumière excitatrice (61).

Après avoir réalisé des mesures de la dépolarisation rotationnelle du fluorophore en fonction du temps, il est possible de mesurer une efficacité de FRET par comparaison de cette dépolarisation intrinsèque et de celle mesurée après ajout du deuxième partenaire d'interaction (62). L'étude de cette accélération de dépolarisation présente l'avantage de pouvoir être utilisée pour étudier deux fluorophores identiques, on parle alors d'homo-FRET. Une présentation très complète de cette technique est donnée par Marc Tramier dans son manuscrit de thèse (63).

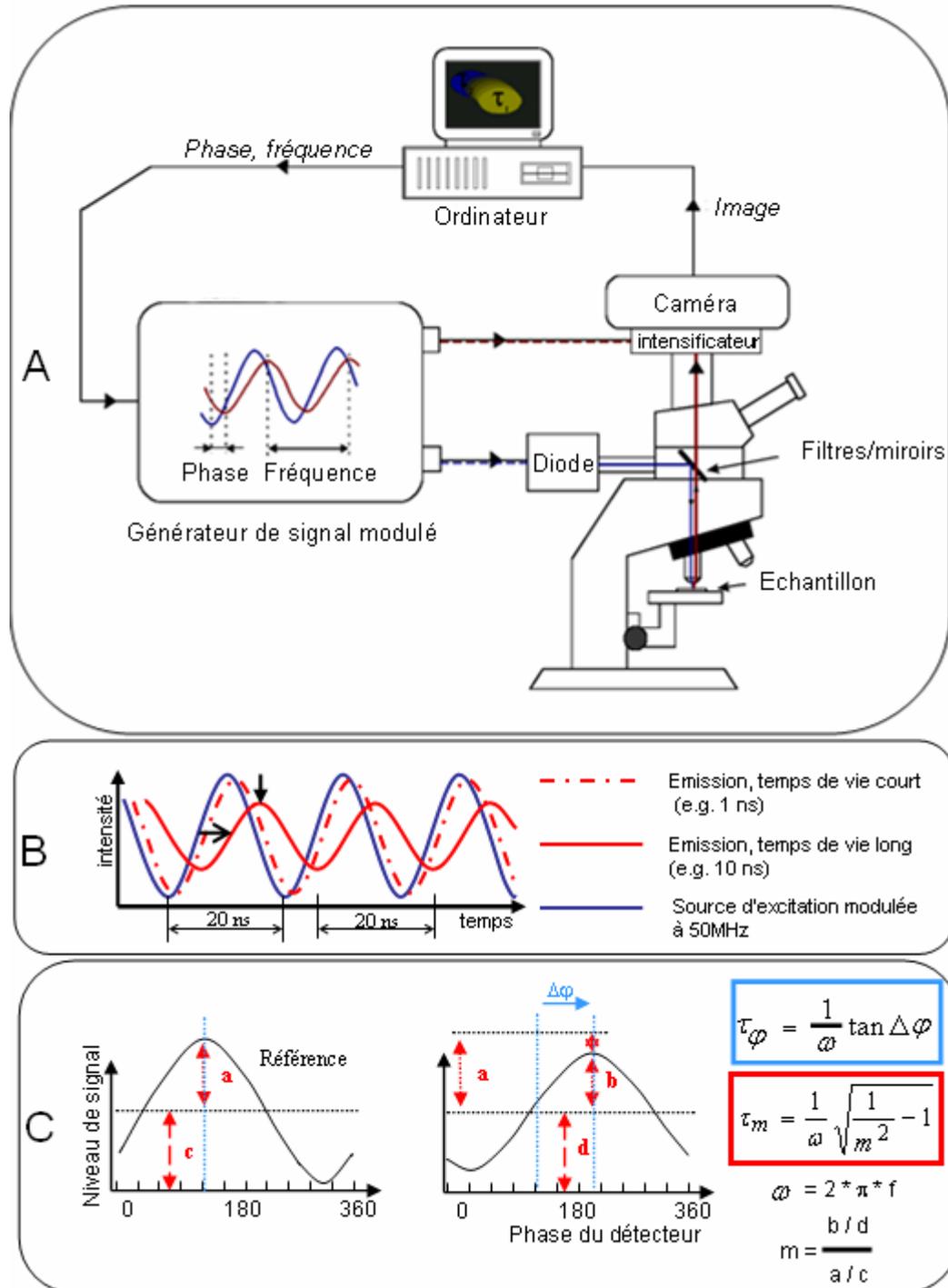
***iv) Méthode de mesure du temps de vie de fluorescence.***

*Les mesures de temps de vie de fluorescence (cf. chapitre précédent) sont classées en deux grandes familles. La première s'effectue dans l'espace des fréquences alors que la deuxième utilise l'espace temps. Nous allons donc passer en revue ces différentes techniques, ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs.*

***(1) Dans l'espace des fréquences.***

Ce type de mesure nécessite une source d'excitation modulée en intensité à une fréquence de 10 à 100MHz et un intensificateur d'image modulé couplé à une caméra CCD. Lorsque le temps de vie d'un fluorophore est long (par exemple 10ns), le fluorophore continue à émettre de la fluorescence au moment où l'excitation est à son minimum. Lorsque le temps de vie est plus court (par exemple 1ns), l'émission de fluorescence apportera une contribution au signal pendant une période très courte après excitation du fluorophore. De ces remarques, on peut déduire qu'un signal d'émission présentant un temps de vie long entraînera une forte diminution de la modulation du signal alors qu'un échantillon à temps de vie court n'entraînera qu'une légère modification de la modulation par rapport à celle du signal d'excitation. De plus, plus le temps de vie sera long, plus on observera un décalage de phase entre la source d'excitation et la lumière émise.

Ces deux paramètres, i.e. la différence de modulation et de phase entre le signal d'excitation et d'émission, sont liés au temps de vie de fluorescence de l'échantillon. Ils peuvent donc l'un et l'autre être utilisés pour effectuer des mesures de temps de vie en comparant ces variations à celles obtenues par des mesures effectuées sur un échantillon référence. La figure suivante présente de façon schématique un tel système d'acquisition (A) ainsi que la représentation d'acquisition de fluorophores de temps de vie courts et longs (B) et la façon dont le temps de vie de fluorescence est extrait de ces données de mesures de phase et modulation (C).



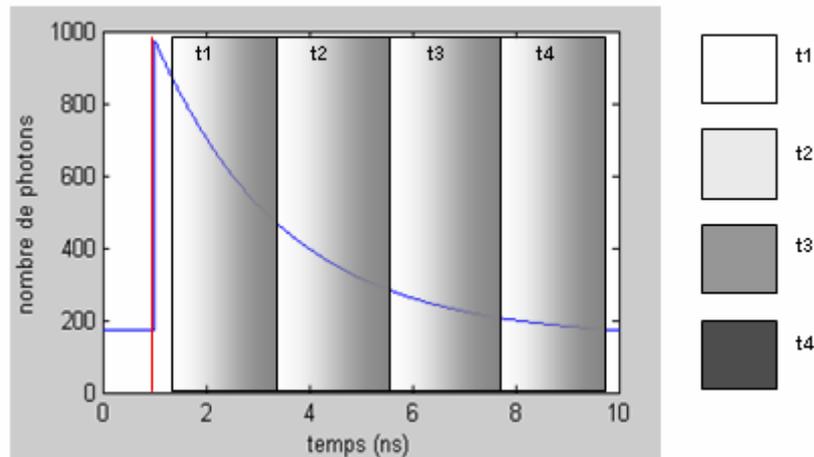
19:A, représentation schématique d'un système d'étude de temps de vie basée sur les mesures d'anisotropie de fluorescence, le LIFA (adapté de Ria Hut, Lambert Instrument. En particulier, le générateur de signal permet de moduler de façon synchrone la diode (excitation) et l'intensificateur (détection). Voir le texte pour plus de détails B, Profil d'intensité au cours du temps d'une source modulée (bleu) et de la fluorescence émise par un fluorophore à temps de vie court ou long (rouge). C, méthode d'extraction du temps de vie de fluorescence à partir de la variation de modulation  $\tau_m$  et de phase  $\tau_\phi$  à partir d'un échantillon de temps de vie connu, par exemple, un miroir dont le temps de vie est de 0 ns, la réflexion étant un processus instantané.

## (2) Dans l'espace temps.

C'est la mesure du temps entre l'excitation d'un fluorophore et la détection d'un photon émis qui est la caractéristique commune à ces différentes techniques. Cette mesure est réalisée de façon différente selon la vitesse d'acquisition et de la résolution temporelle recherchée. Les trois principales sont les suivantes.

- **Système utilisant des caméras à portes temporelles**

Après excitation de l'échantillon par une source pulsée, l'image de l'objet est projetée sur un GOI (Gated Optical Intensifier) dont le rôle est à la fois d'amplifier le signal mais également de ne mesurer les photons émis que pendant un bref intervalle de temps après chaque impulsion. En décalant la zone d'observation et en réalisant une série de 4 à 10 images plein champ (figure 20).

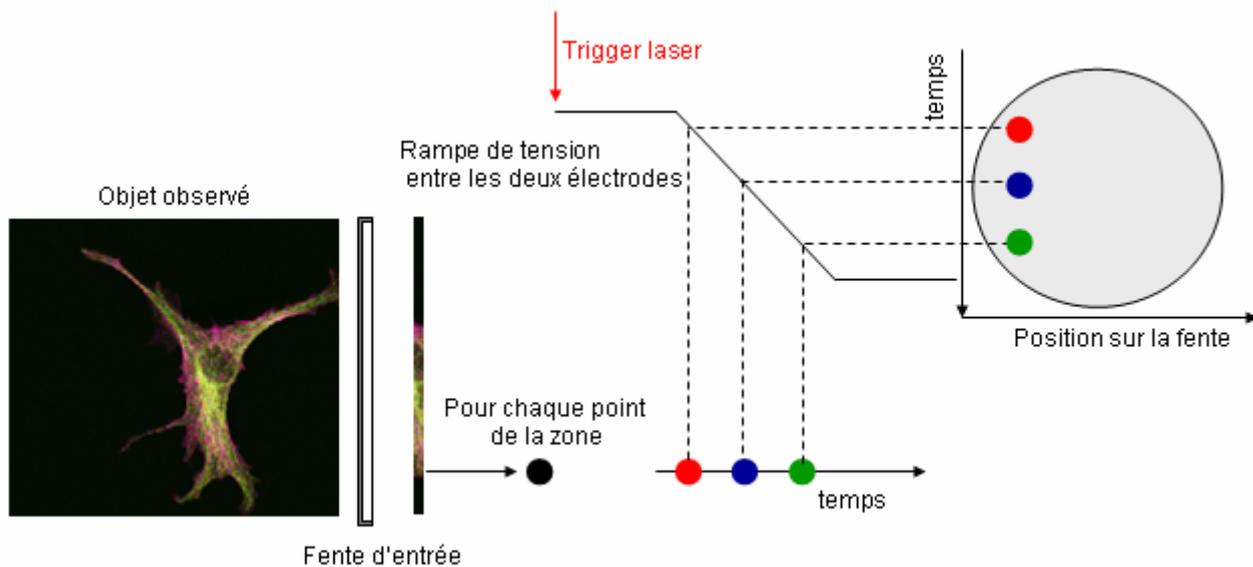


20: illustration du principe d'acquisition d'un système utilisant des portes temporelles avec en rouge, l'impulsion laser et en bleu, la courbe de déclin de fluorescence.

A : le GOI est configuré pour acquérir des images successives correspondant aux canaux temporels t1-t4 illustrés en B. il est alors possible de reconstituer une image de temps de vie à partir de ces 4 images d'intensité.

- **Systèmes utilisant une « streak » caméra**

Dans ce système, la lumière est projetée au travers d'une fente sur la photocathode d'un tube *streak* qui fonctionne de la façon suivante : Les photons reçus à travers la fente sont convertis en électrons. Dans un deuxième temps, ces électrons sont accélérés et passent entre deux électrodes, puis ils sont défléchis dans une direction perpendiculaire à la fente ; l'amplitude de cette déflexion est fonction de leurs temps d'émission (figure 21). Ils arrivent enfin sur une galette de micro canaux (MCP) qui amplifie le signal puis ils sont bombardés sur un écran à phosphore. Il en résulte une image avec en x, l'information relative à la position sur la fente et en y, l'information temporelle.



21 : représentation schématique de la dispersion temporelle obtenue par un système streak

- **Système de mesures TCSPC.**

Ce système est basé sur une carte de comptage de photon TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting). Cette carte va permettre de mesurer le temps entre l'excitation d'un fluorophore et l'émission d'un photon. Les détecteurs utilisés étant généralement des photomultiplicateurs, l'acquisition se fera point par point. Une description plus exhaustive de cette technique sera faite dans le chapitre suivant.

**(3) Bilan sur les techniques de mesure de temps de vie.**

D'un point de vue plus pratique, le choix entre les techniques de mesure dépendra de la question posée et de l'échantillon observé. Les techniques de phase et modulation, de polarisation et de portes temporelles présentent l'avantage d'être rapides et permettent un suivi dynamique des variations du temps de vie. Cette vitesse est au détriment de la précision des mesures temporelles et ne permettra que rarement d'extraire différentes exponentielles d'une courbe de déclin. La méthode de TCSPC présente le compromis inverse, la résolution temporelle étant seulement limitée par les caractéristiques physiques des détecteurs et des cartes utilisés. Elle demande cependant un grand nombre de photons pour reconstituer une courbe complète et le débit de mesure de photons doit être maintenu relativement bas pour éviter des mesures artefactuelles (chap. II.1.b). L'acquisition étant réalisée point par point, l'obtention d'une image de temps de vie nécessitera un balayage de l'échantillon et un temps d'acquisition supplémentaire. Enfin, la caméra *streak* permet de conserver l'information spatiale dans une des dimensions avec une résolution temporelle très satisfaisante. Elle présente par contre des limites importantes quand à la fenêtre temporelle observée. Elle est très efficace et rapide pour les mesures de temps de vie court ( $< 1\text{ns}$ ). Les acquisitions sont plus longues voir impossibles pour des temps de vie plus longs.

Le tableau suivant résume avantages et inconvénients des différents systèmes de mesure de temps de vie.

caractéristique	Phase/modulation	Caméra/GOI	Caméra <i>streak</i>	Système TCSPC
Précision de détermination de $\tau$	+	+	+++	+++
Résolution (x,y,z)	+++	+++	+++	++
Capacité à distinguer plusieurs exponentielles	-	-	+++	+++
Vitesse d'acquisition	+++	+++	++	+/-
Efficacité de mesure pour des temps longs ( $\sim >4\text{ns}$ )	+++	++	-	++/+++
Efficacité de mesure pour des temps courts ( $\sim <4\text{ns}$ )	++	+	+++	+++

**v) Complexité de l'interprétation des mesures de FRET.**

*Comme nous l'avons vu, de nombreuses méthodes existent pour réaliser des mesures de FRET, chacune utilisant différentes propriétés de la lumière. De par ces points de vue différents, elles présenteront des robustesses différentes vis-à-vis des échantillons observés. Les principaux problèmes rencontrés en cellules seront les concentrations variables en fluorophores, l'autofluorescence cellulaire, le chevauchement spectral mais également les niveaux d'interactions trop faibles et les mouvements des échantillons observés.*

*Au delà de ces problèmes liés à l'acquisition, l'interprétation des données demande une bonne compréhension des événements à l'œuvre pour éviter une sur interprétation, voire une interprétation erronée.*

**(I) Complexité liée à la mesure.**

**- L'autofluorescence cellulaire.**

Les cellules peuvent présenter des niveaux d'autofluorescence variables. La fluorescence émise présente le plus souvent des spectres larges associés à des temps de vie courts. La présence d'autofluorescence est donc problématique dans les études basées sur l'intensité de fluorescence et nécessitera une attention particulière, comme l'utilisation d'une décomposition spectrale. Ce problème devient très complexe à résoudre dans les mesures de temps de vie. En effet, le temps de vie court ainsi obtenu pourra facilement être analysé comme du FRET. L'absence d'autofluorescence est donc un pré-requis à toute étude de FRET par mesure de FLIM. Dans le cas contraire, des procédures d'acquisition particulières devront être mises en place comme nous le verrons chapitre III

**- Chevauchement spectral.**

Les fluorophores utilisés pour les études de FRET présentent le plus souvent un chevauchement spectral entre les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur afin d'optimiser le facteur  $J$  de l'équation 6. Les mesures de FRET prenant en compte la fluorescence de l'accepteur doivent apporter des corrections pour éviter une surestimation de la contribution de ce dernier. Le même type de problème est induit par le chevauchement des spectres d'excitation des deux fluorophores,

entraînant une excitation non spécifique de l'accepteur. Les techniques prenant en compte uniquement la fluorescence émise par le donneur ne nécessitent pas ce type de correction à condition d'utiliser un filtre passe-bande spécifique du donneur.

La technique de Pb-FRET subira également de façon indirecte les problèmes liés à ce chevauchement. En effet, le photoblanchiment de l'accepteur peut entraîner une diminution de la fluorescence du donneur par excitation indirecte, conduisant ainsi à une sous estimation du processus de FRET.

- ***Concentration variable de fluorophores.***

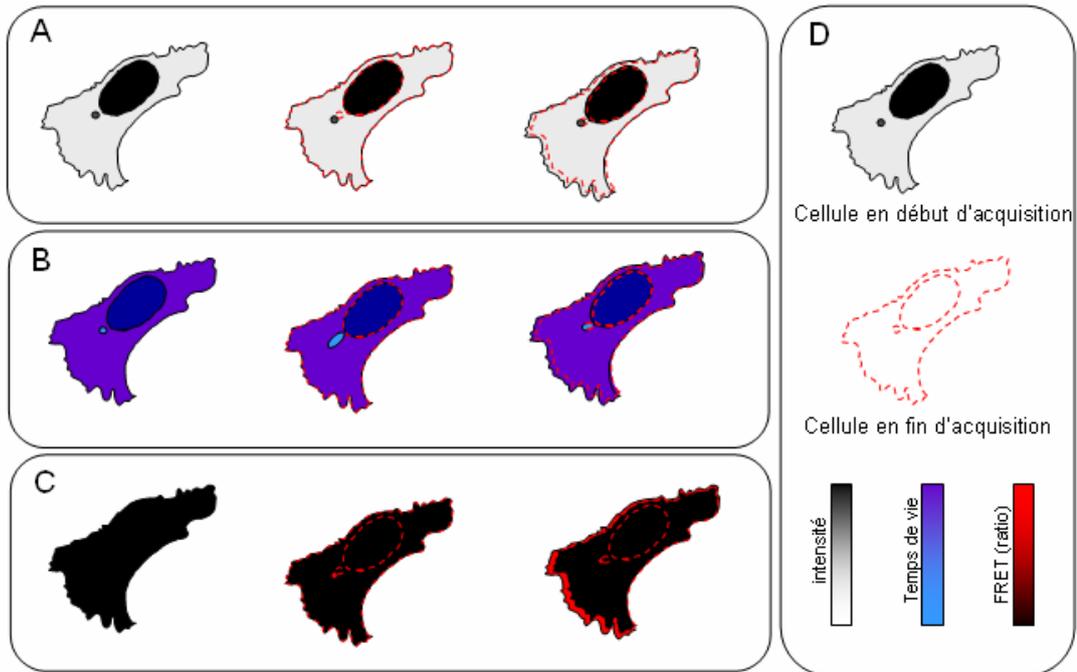
Le premier écueil rencontré pour des niveaux d'expression très différents sera de rendre le signal d'un des deux fluorophores trop faible pour réaliser des mesures. Ce problème devient particulièrement problématique de par le chevauchement spectral déjà mentionné. Les corrections deviennent alors très complexes à appliquer. Les mesures de FLIM ne seront pas affectées par ces problèmes de concentration, le temps de vie étant indépendant de cette dernière. Seule la proportion de l'espèce sera alors modifiée. Comme nous le verrons par la suite, des niveaux variables d'expression poseront également des problèmes pour l'interprétation des données.

- ***Travail en cellule vivante.***

Deux problèmes sont rencontrés dans l'étude du vivant. Le premier est lié à la dynamique des protéines. Il rend les techniques utilisant le photoblanchiment de fluorophores, tel le pbFRET, très complexes à mettre en œuvre. En effet, un recouvrement partiel de la zone photoblanchie entre le photoblanchiment et l'acquisition suivante sera observé pour toutes les protéines présentant un mouvement rapide de type diffusif. Ce type d'acquisition nécessite alors de blanchir la totalité de la cellule pour éviter ces recouvrements.

Un autre problème plus général provient du mouvement des cellules ou de l'organe étudié (figure 22). Ce problème entraînera un effet de flou lors des acquisitions de temps de vie (figure 22, B), réduisant la résolution spatiale. Ce problème devient beaucoup plus critique pour toutes les acquisitions utilisant des acquisitions séquentielles (acquisitions impliquant un changement de filtres ou acquisition spectrales séquentielles). Dans ce cas, un effet de bord important sera

observé, ce qui rend impossible l'analyse de ces zones (figure 22 C). Ce problème peut devenir crucial lors de l'étude de structures « rapides » telles certaines vésicules, ces dernières pouvant parcourir en moyenne 1  $\mu\text{m/s}$ . Dans des conditions d'acquisition confocale classique, le temps d'acquisition est classiquement de 500ms par image pour une largeur de pixel de 0.3 $\mu\text{m}$ . On aura alors un décalage de  $\sim 2$  pixels entre deux images consécutives.



22: représentation schématique d'une situation rencontrée en cellule vivante: exemple d'une cellule exprimant un seul fluorophore (témoin négatif de FRET) présentant un temps de vie variable en fonction des compartiments cellulaires. La cellule de gauche représente le début de l'expérience, la cellule centrale montre l'effet d'un mouvement d'une vésicule et celle de droite d'un déplacement global de la cellule.

A : images d'intensité

B : mesure de FLIM

C : images de FRET utilisant un ratio d'intensité du donneur

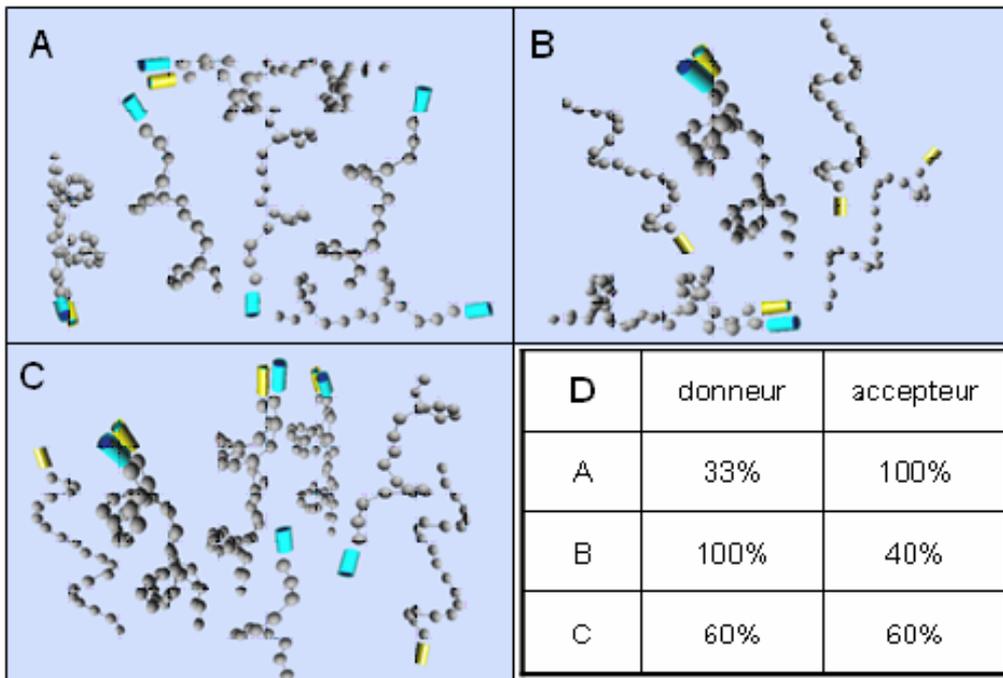
D : code couleur utilisé pour les éléments A-C

**(2) Interprétation des données.**

**- Corrélation des niveaux d'expression des fluorophores.**

Le niveau de FRET mesuré dépend de la proportion de molécules en interaction et de leur proximité. Pour comparer la proportion de molécules en interactions, il est important d'avoir des niveaux d'expression relatifs constants. En effet, si la proportion d'expression change, l'équilibre de la réaction va s'en trouver bouleversé ; la protéine la moins abondante aura plus de chance de trouver un partenaire si sa concentration augmente.

Un deuxième élément à prendre en compte est le fluorophore. Certaines techniques nous permettent d'étudier la proportion de donneur en interaction (exemple : Pb-FRET, FLIM), alors que d'autres s'intéressent à la proportion d'accepteur en interaction (exemple : rapport d'intensité de l'accepteur). Ces deux modes d'étude donneront des résultats très différents sauf dans le cas d'une équimolarité des deux partenaires (Figure 23).



23: A-C, représentation schématique de trois événements de FRET avec en gris, les protéines marquées; en bleu le donneur et en jaune l'accepteur. D, proportion de donneurs et d'accepteurs en interaction pour les cas A-C. seul le cas équimolaire (C) nous donne les mêmes résultats dans les deux cas

La meilleure solution pour simplifier ces problèmes d'interprétation consiste donc à faire des expériences avec des concentrations comparables pour les deux fluorophores étudiés. Cette solution est facile à mettre en œuvre pour les études en

solution mais elle devient plus complexe à contrôler dans des cellules, en particulier pour des fluorophores ayant des rendements quantiques différents.

- **Limites des équations.**

Un élément fondamental à prendre en compte lors de l'utilisation d'une équation est les présupposés qu'elle implique. En particulier, les équations 5 et 6 (résumées par l'équation 5'), qui relient l'efficacité de FRET à la distance entre les molécules présentent deux limitations importantes (45).

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \frac{1}{1 + \left( \frac{r}{\left\{ \frac{9000 (\ln 10) K^2 Qd J}{128 \pi^5 n^4 N_{av}} \right\}^{1/6}} \right)^6} \quad \text{Eq. 5'}$$

Par définition, cette équation est applicable uniquement si le donneur et l'accepteur sont séparés d'une distance fixe. Ce cas de figure est courant dans le cas de FRET intramoléculaire où seules deux configurations de la molécule existent, dont une donnera lieu à un phénomène de FRET. La majorité des interactions intermoléculaires donneront lieu à de nombreux états transitoires. La valeur mesurée correspond donc à la distance moyenne entre les deux molécules.

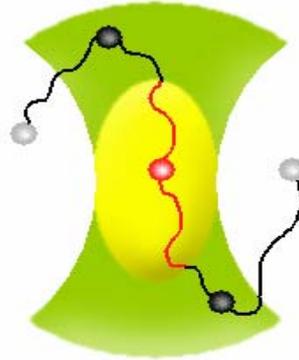
Le calcul de la distance,  $r$ , dépend alors de  $E$  et de  $R_0$ . La détermination de  $R_0$  doit donc être la plus précise possible. Comme décrit dans l'équation 4,  $R_0$  dépend notamment du facteur d'orientation  $k$ . L'assimilation à une rotation libre permet de fixer  $k=2/3$ . Dans le cas d'orientations préférentielles des protéines étudiées, il est pratiquement impossible de déterminer ce facteur  $k$  avec précision. Les mesures de distances entre fluorophores nécessitent donc de poser comme hypothèse de départ une orientation aléatoire.

Une limite supplémentaire est spécifique des mesures de temps de vie. En effet, de nombreux fluorophores comme la CFP, donneur de FRET populaire en biologie, présentent des déclins multi-exponentiels (pour la CFP de 2 à 5 espèces, présentant

chacune une décroissance exponentielle, ont été mesurées en solution). Le déclin de fluorescence d'un échantillon présentant une interaction partielle comportera donc de 4 à 10 espèces exponentielles dans la zone d'émission de la CFP seule. Au regard du nombre de photons constituant des courbes de déclin de fluorescence en microscopie, l'ajustement par ce type de modèle est impossible et nécessite l'approximation de ces déclins aux temps de vie moyens des deux espèces de donneurs. Une analyse précise du facteur E nécessite donc de choisir des fluorophores mono-exponentiels comme donneurs de FRET. Les deux principaux fluorophores utilisés actuellement sont la GFP et la Cerulean FP(53)

## d FCS

Cette technique est basée sur l'étude du temps de résidence de molécules dans un volume très faible et de taille connue(64), généralement de l'ordre du femtolitre (figure 24)



24: illustration du trajet d'un fluorophore dans un volume d'excitation confocal (vert)  
Le fluorophore commence en dehors du volume d'excitation (gris), y rentre (noir), puis rentre dans le volume d'observation figuré en jaune. La fluorescence est alors collectée pendant la durée du trajet figurée en rouge

Ce volume peut être obtenu en utilisant un microscope confocal ou un système d'excitation à 2-photons. Dans un système où le nombre de fluorophores est suffisamment faible (<1000), il est possible d'analyser les fluctuations de fluorescence pour obtenir des informations sur le nombre de molécules et leur temps de résidence moyen dans le volume d'excitation grâce au calcul de la fonction d'autocorrélation:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F_{(t)} \delta F_{(t+\tau)} \rangle}{\langle F_{(t)} \rangle^2} \quad \text{Eq. 8}$$

Avec

$$\delta F_{(t)} = F_{(t)} - \langle F_{(t)} \rangle \quad \text{Eq. 9}$$

$\tau$ , le temps de corrélation,  $t$  le temps.

$G(\tau)$  permettra de déduire des informations telles la constante de diffusion des molécules, leur brillance et leur concentration.

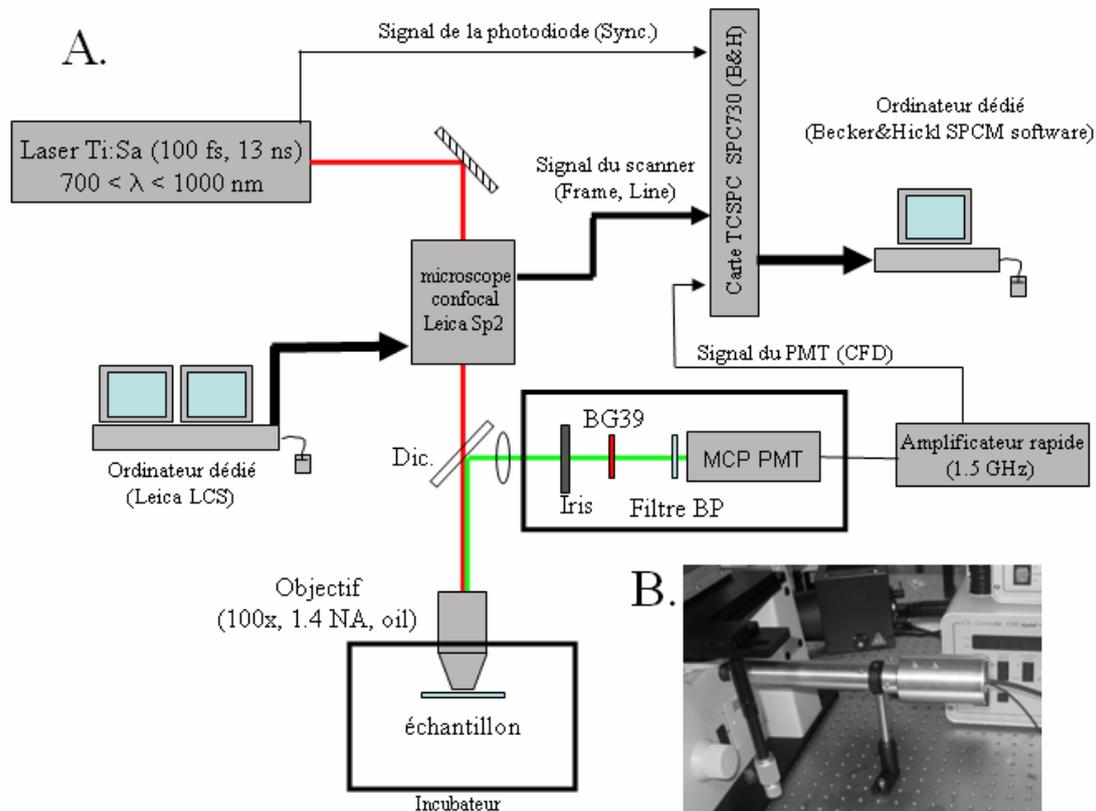
## II. Mesures de temps de vie de fluorescence.

Les mesures de temps de vie de fluorescence nécessitent une instrumentation dédiée ainsi qu'une caractérisation du système afin d'être robustes, précises et reproductibles. Nous allons donc passer en revue les étapes indispensables de cette caractérisation ainsi que les éléments critiques du dispositif instrumental à savoir les sources d'excitation et les détecteurs. Nous verrons ensuite diverses applications de ce dispositif à différentes problématiques biologiques ainsi que les adaptations spécifiques à ces dernières. En particulier, nous nous attarderons sur les optimisations qui peuvent être apportées à l'analyse de nos mesures, au niveau de l'analyse des courbes de déclin et des images de FLIM.

### Section.1 Métrologie.

#### a Composition du système.

Le système de mesure de temps de vie que nous avons implémenté dans le laboratoire (figure 25) est composé d'une source laser pulsée, d'un détecteur ayant une haute résolution temporelle et d'une carte de comptage de photons.

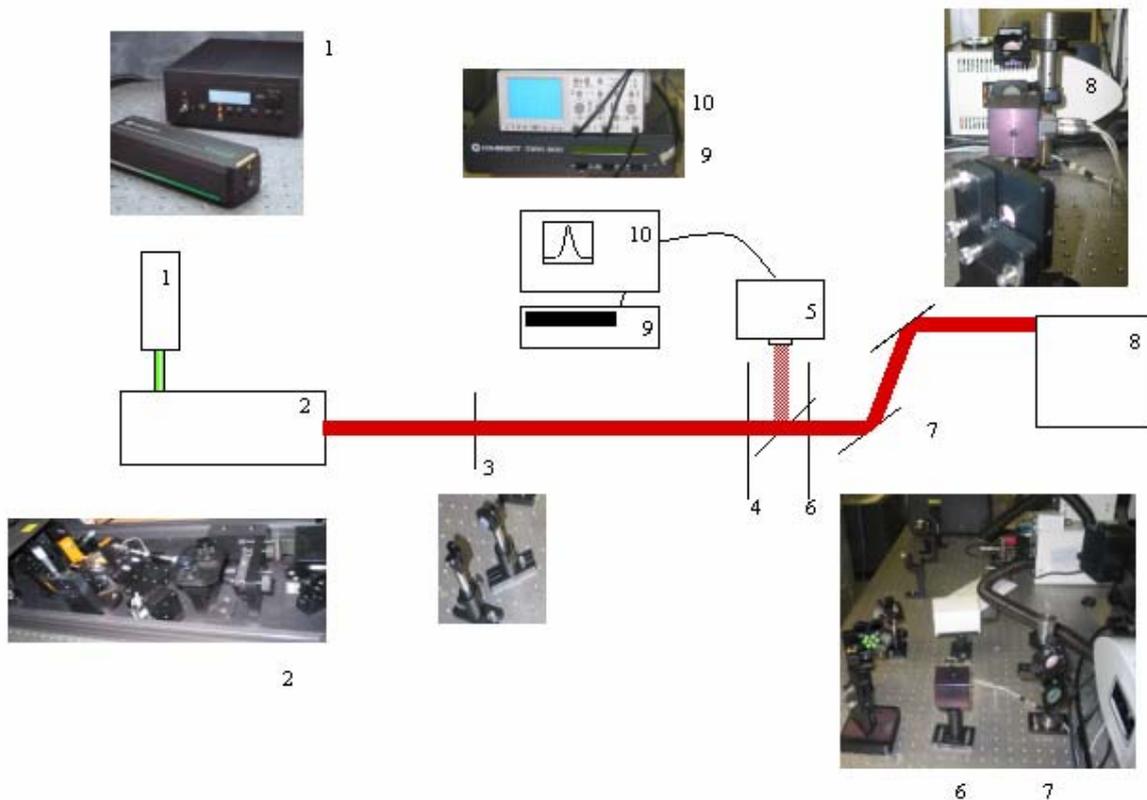


25: représentation schématique de notre système de mesure de temps de vie (A) et photographie du tube optique permettant le couplage entre le microscope et le détecteur MCP (B)

- **Source laser et étirement du faisceau :**

Lors de la mise en place de cette chaîne de mesure des temps de déclin de fluorescence, en 2002-2003 les solutions les plus fiables faisaient appel à des sources laser pulsées titane : saphir. En effet après une large diffusion en physique, ce type de laser a été popularisé en biologie par les travaux de Watt Webb (65,66) en particulier pour la réalisation de microscope multi photons. De par son cadencement et la faible durée de ces impulsions, ce laser est aussi une bonne source pour les mesures de déclin de fluorescence. Ainsi plusieurs systèmes de mesure de temps de vie de fluorescence utilisent ce type de source (67-69). Le choix du Mira 900-F, (Coherent Inc.) pompé à 5W par un laser Verdi a été fait avant mon arrivée dans le laboratoire. Ce laser permet d'obtenir une largeur d'impulsion inférieure à 200fs pour une fréquence de 76MHz, ce qui correspond à une fenêtre temporelle de 13ns entre chaque impulsion. La longueur d'onde accordable entre 700 et 930nm nous permet d'exciter les principaux fluorophores utilisés comme donneurs dans les expériences de FRET i.e. CFP, GFP et leurs variants.

Son implémentation a été effectuée de la façon suivante (figure 26) :

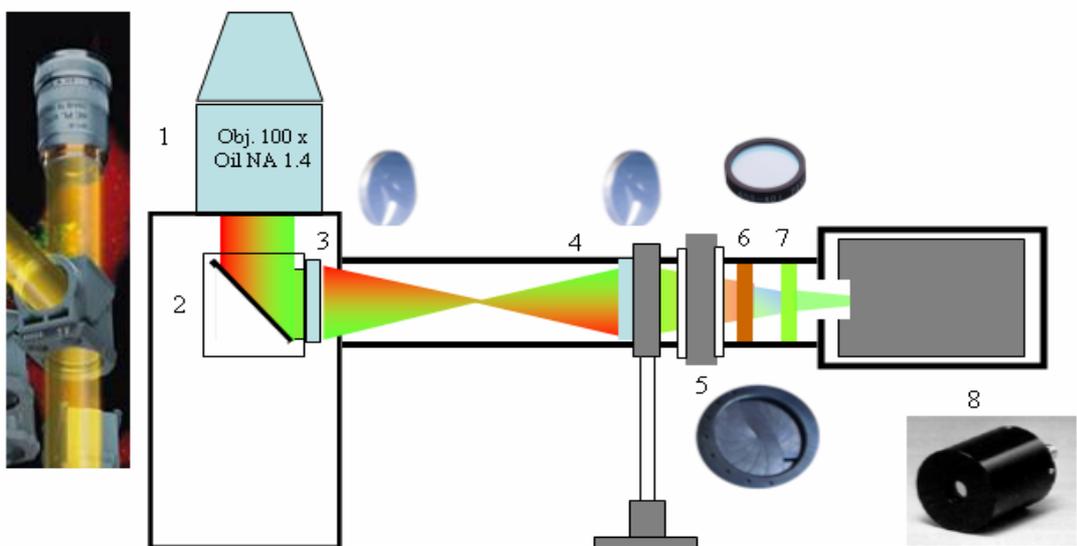


26: Schéma de l'adaptation du laser MIRA 900-F comme source d'excitation pour le confocal LEICA SP2 (voir le texte pour plus de détails)

Tout d'abord, le faisceau laser de pompe (1) rentre dans la cavité titane : saphir (2). Cette cavité comporte des parties mobiles réglables, qui permettent de régler la longueur d'onde de sortie du laser. Le faisceau de sortie est alors introduit au niveau d'un télescope, composé d'un miroir concave et d'un miroir plan, (3) pour limiter sa divergence. Une roue à filtres (4), permet d'adapter l'intensité lumineuse en fonction des acquisitions que nous allons réaliser. Une lame de verre est également placée sur le trajet optique et 8% de la lumière est réfléchiée dans un analyseur de spectre (5) (IST, modèle E-201) connecté à un oscilloscope (10), facilitant ainsi les réglages du laser. Un obturateur (6), puis deux miroirs servant de périscope (7), amènent alors le faisceau à l'entrée de la tête du scanner (8) qui permettra de balayer l'échantillon.

- **Détecteur :**

Une galette de micro canaux (MCP PMT, R3809U-52) est utilisée pour les mesures de temps de vie. Le détecteur possède un temps de transit très faible donnant au système, comme nous le verrons par la suite, une très bonne résolution temporelle. Deux choix se présentaient à nous quant à la position du détecteur, le microscope confocal Leica SP2 comportant une sortie descannée et une autre non descannée. L'illumination de notre échantillon étant réalisée par excitation à 2 photons, le sectionnement optique en z ne nécessite pas le passage par le *pinhole* du microscope. Pour limiter les pertes de lumière induites par un trajet optique plus long, nous avons choisi la position non descannée se trouvant directement en sortie d'objectif. Nous avons alors réalisé un tube nous permettant d'introduire les différents éléments d'optique indispensables au bon fonctionnement du



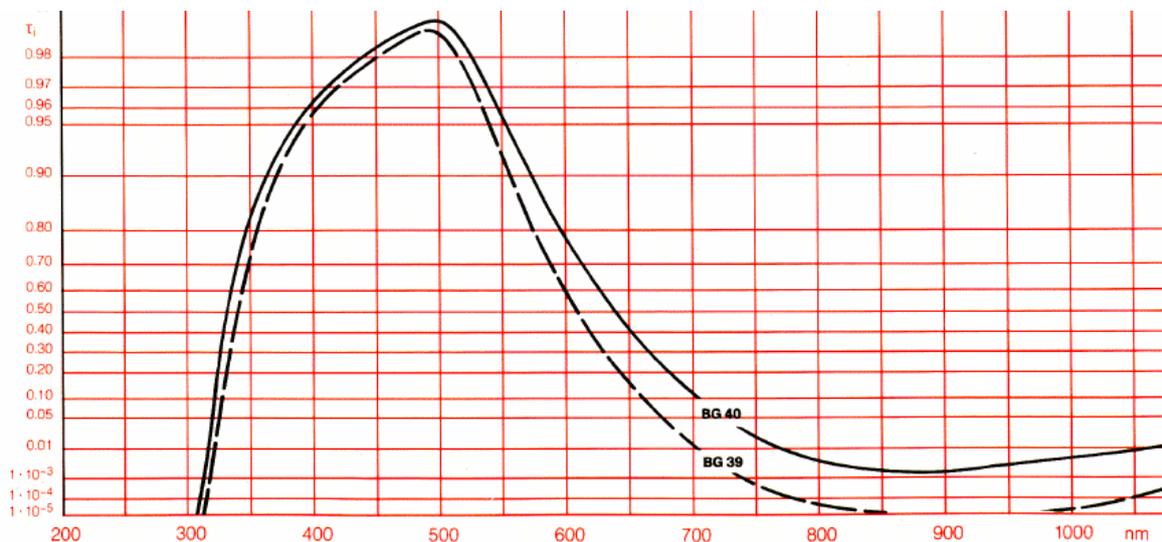
27: schéma du tube optique de couplage de la MCP (voir le texte pour plus de détails)

détecteur (figure 27).

Tout d'abord, une lentille convergente (3) est placée à la sortie du miroir dichroïque (2) permettant de focaliser le faisceau sortant de l'objectif (1). Un tube en aluminium, solide, léger et facilement usinable est alors tourné. A l'extrémité de ce tube, une lentille (4) est positionnée pour projeter l'image de la pupille arrière de l'objectif sur la photocathode du détecteur (8). Un autre tube plus court et fileté est ajouté pour accueillir des filtres. Dans un premier temps, un filtre bloquant les infrarouges, permet d'assurer la sécurité du MCP mais aussi d'éviter de polluer le signal par des réflexions du laser. Le filtre BG39 (6) est tout indiqué pour ce rôle, ce dernier bloquant presque totalement la lumière pour les longueurs d'onde supérieures à 750 nm (figure 28).

Un autre filtre amovible faisant office de passe-bande pourra également être placé (7). Il ne laissera passer que la lumière ayant une longueur d'onde correspondant au fluorochrome observé. En l'occurrence, nous avons choisi un filtre spécifique de la CFP, le XF3075, ainsi qu'un filtre spécifique de la YFP, le XF3079.

Enfin, un iris dit « zero aperture » (5), car il ne laisse absolument pas passer la lumière une fois fermé, est adapté entre les deux tubes. Il est muni d'un système de blocage pour éviter une ouverture involontaire lors de l'utilisation du microscope pour des acquisitions classiques.



28: pourcentage de transmission des filtres BG-39 et BG-40 en fonction de la longueur d'onde

- **Carte de comptage de photons :**

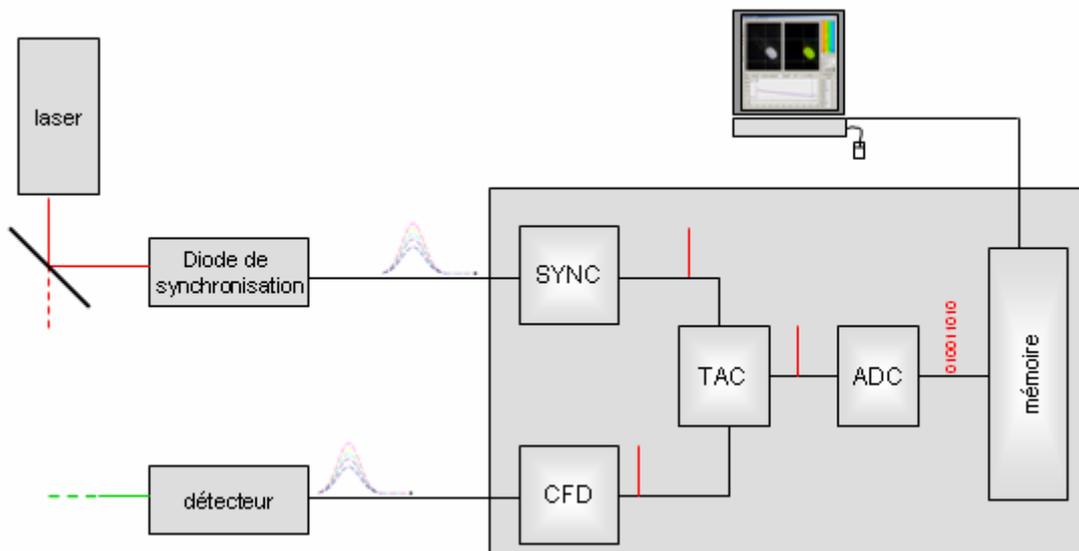
Les informations fournies par le détecteur doivent être rendues exploitables par une carte d'acquisition. Le système SPC-730 fourni par la société Becker et Hickl remplit parfaitement ce rôle ; il est capable de traiter les données très rapidement avec une fréquence maximale de comptage de 5MHz et il permet différents modes d'acquisition allant du système de détection en temps réel sur un point jusqu'à l'acquisition complète d'images.

Ce système de traitement de l'information est composé d'une carte d'acquisition et d'un logiciel de visualisation. Il va nous permettre de trier les photons très rapidement en fonction du temps de latence entre l'excitation du fluorophore et l'émission de fluorescence, puis de les localiser dans l'espace afin d'obtenir des images de temps de vie de fluorescence (FLIM). Le taux de comptage maximal que nous avons utilisé est toujours au maximum égal à 1% de la fréquence d'excitation afin d'éviter les effets dits de « pile-up ». Dans le cas des images de temps de vie, cette vérification doit être faite sur le point le plus brillant et non sur le flux moyen de photons fourni en continu par la carte.

## b Electronique des cartes de comptage de photons Becker et Hickl (B&H).

### i) Vue d'ensemble de la carte

Différents éléments sont communs à toutes les cartes de comptage de photons B&H qui peuvent être décrites de façon modulaire. Les signaux provenant du laser ou du détecteur arrivent au niveau de deux systèmes d'entrée respectivement SYNC (pour synchronisation) et CFD (Constant Fraction Discriminator). Ils sont alors transmis à un système de conversion temps / amplitude (TAC pour Time Amplitude Converter). Le signal analogique est transformé en signal digital au niveau de l'ADC (Analogic Digital Converter) et pourra alors être stocké dans la mémoire de la carte. La figure 29 présente les principaux éléments du système. Une description plus exhaustive est fournie dans la documentation des différentes cartes (70)



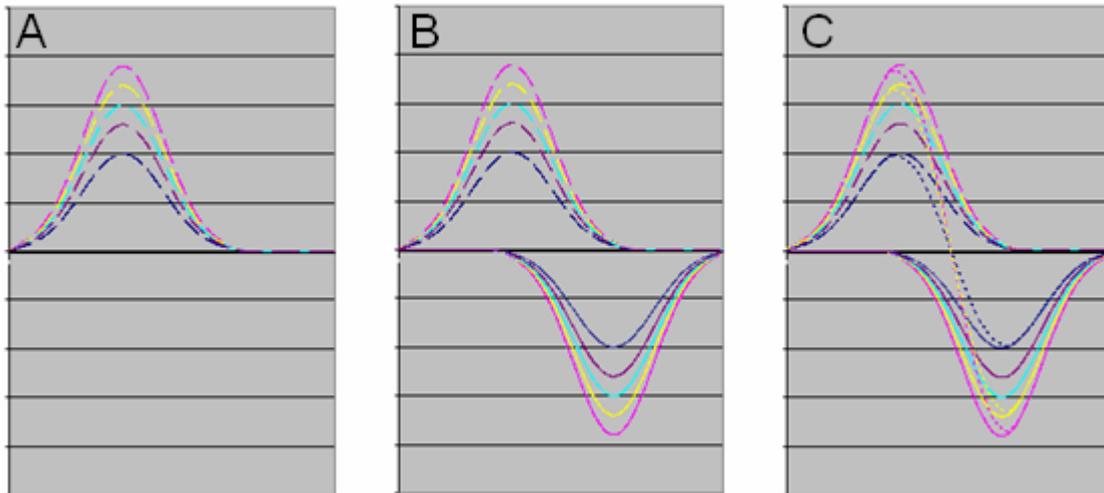
29: représentation schématique des éléments logiques du fonctionnement des cartes B&H

### ii) Les éléments constitutifs de la carte

#### (1) CFD et SYNC

Les blocs CFD et SYNC ont tous deux comme rôle de déterminer précisément le temps d'arrivée du signal respectivement du détecteur et du laser. L'amplitude de ces signaux étant variable (figure 30 A), l'utilisation d'un seuil ne fournit pas la précision requise pour ce type de mesures. La solution la plus précise consiste à doubler le signal puis à le décaler dans

le temps et d'inverser le deuxième signal obtenu (figure 30 B). La somme des deux signaux obtenue sera égale à zéro au temps d'arrivée du signal, et ce, quelque soit son amplitude initiale (figure 30 C).



*Figure 30: illustration des différentes étapes (B et C) de détermination du temps d'arrivée d'un signal d'amplitude variable (A) avec en pointillés longs, le signal initial ; en traits pleins, le signal décalé et inversé ; en pointillés courts, le signal final.*

## **(2) TAC**

Les signaux provenant du CFD et du SYNC doivent ensuite être convertis en une différence de temps. Le TAC comporte une rampe de tension linéaire qui sera déclenchée par l'arrivée d'un signal du CFP et arrêtée à l'impulsion laser suivante (signal de SYNC). La tension de sortie du TAC sera donc proportionnelle au temps d'arrivée d'un photon (figure 31). Le fait de calculer le temps entre l'arrivée d'un photon et l'impulsion laser suivante peut sembler contre intuitif. Elle permet cependant de ne déclencher la rampe qu'à l'arrivée d'un photon. La rampe présentant un temps mort, un déclenchement à chaque impulsion laser pourrait entraîner l'arrivée de photons pendant un de ces temps morts, en particulier pour les photons présentant un temps d'émission court

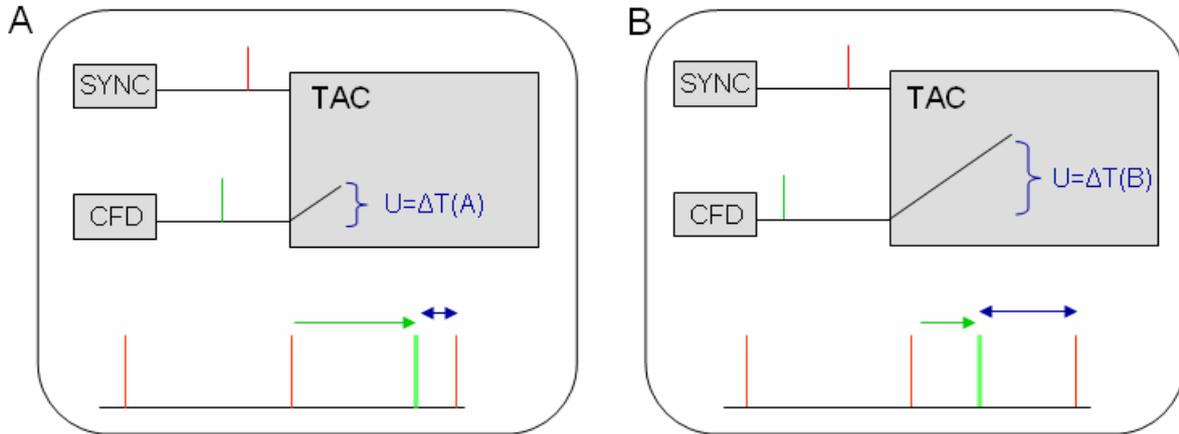


Figure 31: fonctionnement du TAC pour déterminer le temps d'émission d'un photon long (A) ou court (B). En rouge, les temps d'arrivées des impulsions laser, en vert, celui des photons et en bleu les temps calculés au niveau de la rampe de TAC.

### (3) ADC

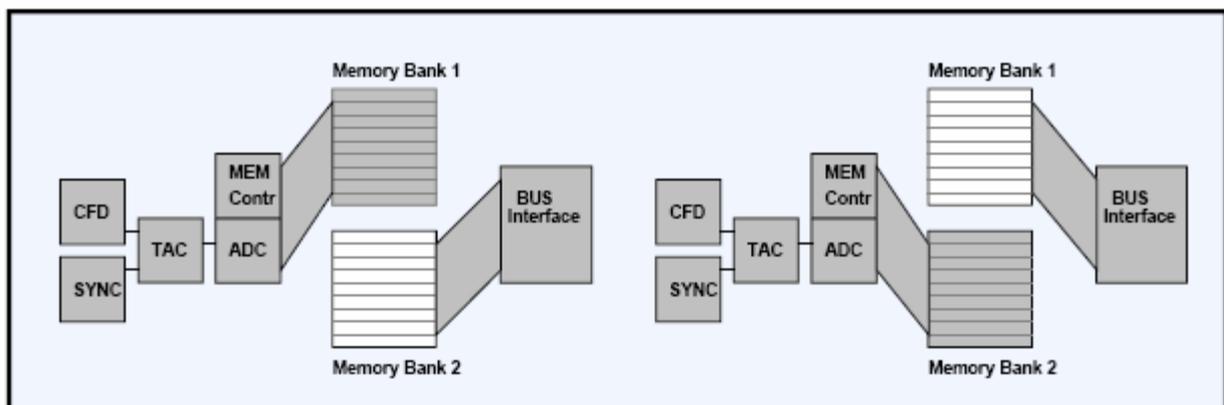
Cette tension provenant du TAC doit ensuite être convertie en signal digital pouvant être enregistré en mémoire puis interprété au niveau de l'ordinateur. C'est à ce niveau que l'échantillonnage final du signal va être déterminé. Un échantillonnage fin donnera une grande précision à la mesure alors qu'un échantillonnage plus large réduira le temps d'acquisition. Ces deux paramètres devront donc être pris en compte au moment de faire ce choix.

### iii) Architecture mémoire

Le type d'architecture mémoire dans lequel le signal en provenance de l'ADC est stocké va conditionner le type de mesures qui pourront être réalisées. Le type de mémoire implémenté constitue la différence principale entre les différentes cartes de comptage de photons. Nous allons donc passer en revue les types de mémoires et leurs applications.

#### (1) Mémoire à flux continu

Ce système utilise deux blocs mémoire distincts. Lors d'une acquisition, ou d'une série d'acquisitions, l'information sera stockée sur un des blocs mémoire pendant que l'autre est lu et les informations qu'il contient sont stockées dans le disque dur. En alternant les blocs actifs et lus, il est possible de mesurer un nombre infini de photons, sans jamais saturer la mémoire. Ce type de mémoire est indispensable pour toutes les applications où le rafraîchissement de la mémoire entraînant un temps mort de mesure est fortement préjudiciable, comme par exemple les expériences de suivi sur molécules uniques. Les cartes SPC-134, -600, -630 permettent ce type d'expériences.

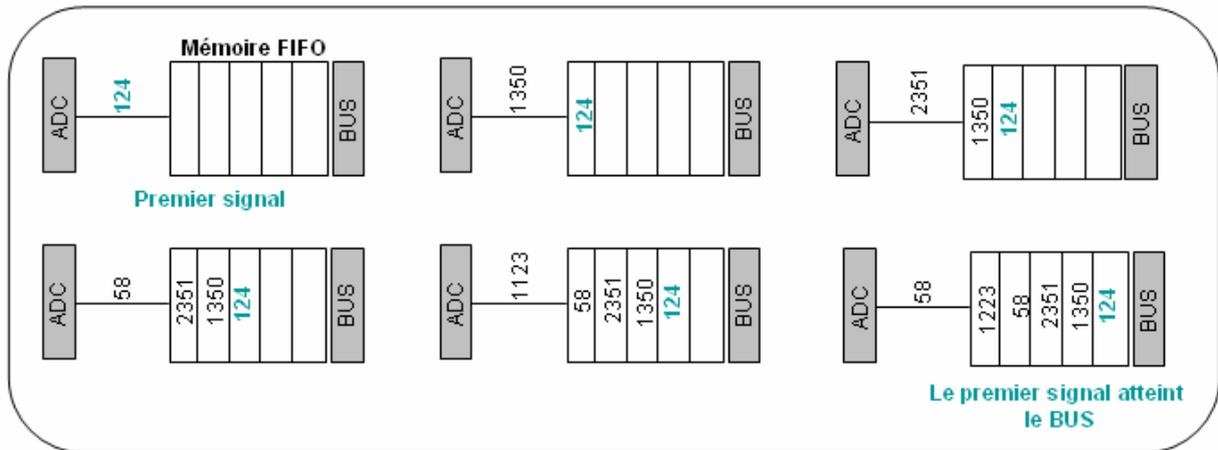


32: principe de fonctionnement de la mémoire à flux continu B&H (figure tirée de la documentation des cartes B&H)

#### (2) Mémoire FIFO

La structure mémoire FIFO, pour « first in, first out », va enregistrer les photons un par un et non, les accumuler dans un histogramme de déclin complet. Pour chaque signal sortant de l'ADC, un temps d'arrivée du photon est mesuré, passe par la mémoire et est ensuite stocké dans la mémoire tampon de l'ordinateur puis sur son disque dur. A ce temps d'arrivée est associé le temps d'émission du photon depuis le début de l'expérience, information indispensable pour les mesures de FCS. Le nombre total de photons mesuré est donc illimité, seul le taux de comptage instantané est limité par la taille de la mémoire FIFO.

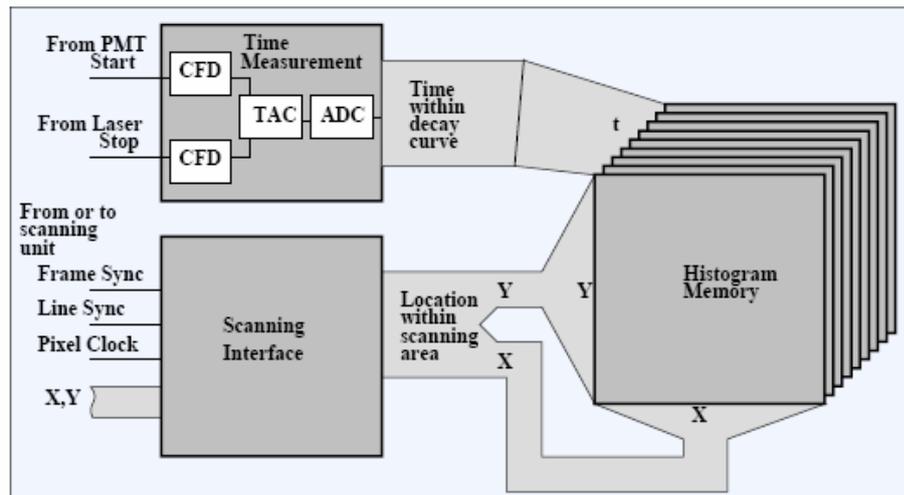
Cette limite est cependant négligeable pour les expériences de FLIM classiques. En effet, la fréquence instantanée maximale des cartes B&H est de 8Mhz, la fréquence d'excitation classique étant de ~80Mhz, la fréquence d'acquisition maximale est limitée à 800 khz, afin d'éviter les effets de *pile-up*, la limite d'acquisition sera donc induite par cette contrainte physique et non par la mémoire de la carte. Les cartes SPC-134, -144, -6x0 et 830 permettent d'effectuer de telles mesures.



33 : chemin suivi par le signal de sortie de l'ADC dans une mémoire FIFO. Pour chaque impulsion, seul le temps d'arrivée du photon est représenté.

### (3) Mémoire matricielle multicouche

Ce type de mémoire est indispensable pour réaliser des images de temps de vie. Elle permet une synchronisation avec le système de balayage de l'échantillon. Chaque signal provenant de l'ADC sera alors couplé à une position x,y dans l'échantillon, l'information temporelle étant stockée dans la troisième dimension de la matrice. La taille totale de la mémoire étant utilisée à la fois pour l'information spatiale et temporelle. Par exemple, la carte SPC-730 dispose de  $2E^{22}$  blocs pour décrire chaque impulsion. Il sera (par exemple) possible de réaliser des images 256x256 pixels avec une résolution temporelle de 64 canaux ou une image 64x64 avec 1024 canaux en exploitant dans les deux cas la totalité de l'espace mémoire. Les cartes SPC -7x0, -830 et 144 permettent de réaliser des images de temps de vie de fluorescence.



34 : système logique permettant d'associer les dimensions  $x$ ,  $y$ ,  $t$  à chaque photon émis (figure tirée de la documentation des cartes B&H)

### **c Instrumentation (71).**

*La mise en œuvre de tout système de mesure nécessite une caractérisation instrumentale rigoureuse. Pour réaliser des expériences de FLIM, différentes étapes de caractérisation sont donc indispensables comme la mesure de réponse instrumentale ou la détermination des paramètres limites d'utilisation du système. Pour cela, différentes solutions de références sont utilisées avant la validation du système sur des échantillons biologiques connus nous permettant de déterminer sa capacité à mesurer du FRET, et donc les interactions protéines/protéines, en cellules vivantes.*

*Ce travail a donné lieu à une publication (référence disponible en annexe de ce manuscrit)*

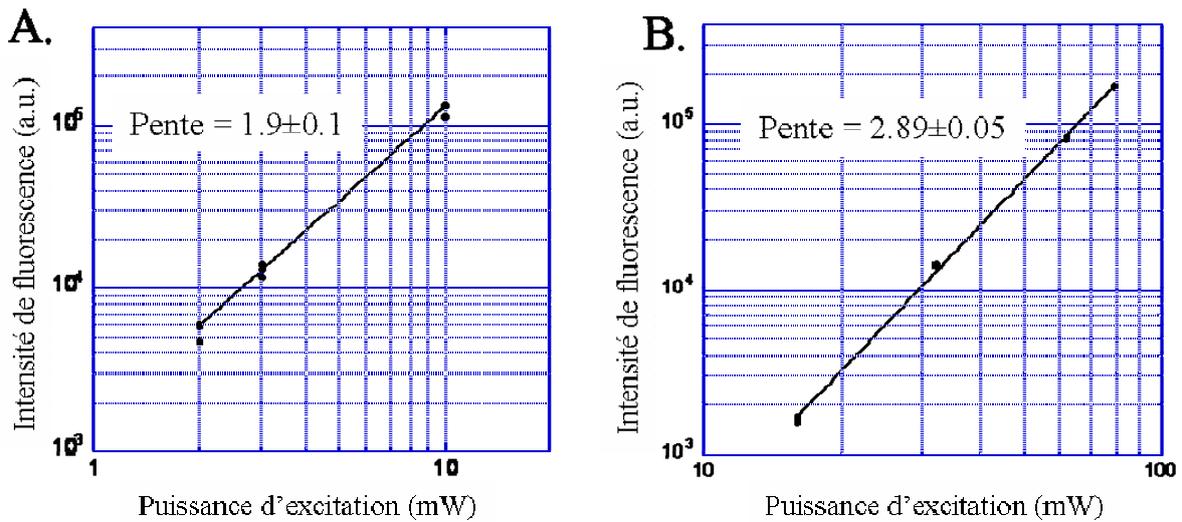
#### **i) Caractérisation instrumentale du système d'acquisition.**

##### **(1) Mesures du bruit :**

Tout d'abord, le niveau de signal détecté iris fermé ou « dark count ». Le système étant maintenu dans l'obscurité totale, cette mesure nous permet de déterminer les paramètres de seuil appliqués en entrée de carte. Une fois ces réglages réalisés, le bruit du système est de l'ordre de quelques photons détectés après une accumulation de 100s dans des conditions où l'excitation d'un échantillon donne entre  $10^3$  et  $10^5$  photons/s. Le bruit de la pièce a également été mesuré (iris ouvert et niveau de lumière environnante identique à celui obtenu lors de nos mesures), donnant un flux compris entre 10 et 100 photons/s et assurant un rapport signal sur bruit compatible avec nos mesures.

##### **(2) Capacité d'excitation à 2 et 3 photons.**

Nous avons ensuite testé la capacité de notre système à réaliser une excitation bi et tri-photonique. Pour cela, nous avons utilisé une solution de rhodamine 6G et une excitation à 830nm. En faisant varier la puissance d'excitation du laser et en mesurant le nombre de photons émis, il est possible de vérifier que la fluorescence émise varie comme le carré de la puissance d'excitation. La pente mesurée de  $1.9 \pm 0.1$  (figure 35 A) confirme bien que l'émission de fluorescence est due à une absorption bi-photonique. De la même façon, nous avons effectué les mêmes mesures sur du *p*-terphenyl. Le nombre de photons émis par cette solution varie alors comme la puissance troisième de la puissance d'excitation (figure 35 B), comme attendu après une absorption tri-photonique (72).



35: intensité de fluorescence en fonction de la puissance moyenne d'excitation pulsée à 830 nm. Mesures réalisées sur la rhodamine 6G (A) et sur le p-terphenyl (B)

### (3) Mesure de la réponse instrumentale :

Le temps de réponse instrumentale est une des caractéristiques fondamentales d'un système de mesure temporel :

- Si ce temps de réponse est très élevé en comparaison du phénomène observé, toute mesure devient impossible. Ainsi, un système présentant une réponse instrumentale de plusieurs nanosecondes ne permettra pas d'étudier des phénomènes picoseconde.
- Si le temps de réponse est du même ordre de grandeur que les temps de vie que nous voulons mesurer, l'analyse du signal pourra être améliorée par des techniques de convolution du modèle d'ajustement par la réponse de l'instrument. Pour les études de FRET effectuées sur des fluorophores classiques, la FWHM (Full Width at Half Maximum) maximum sera de l'ordre de la nanoseconde.
- Enfin, si le temps de réponse de l'instrument est suffisamment faible, et qu'il devient négligeable par rapport au phénomène étudié, il permettra de s'affranchir de ce processus de convolution.

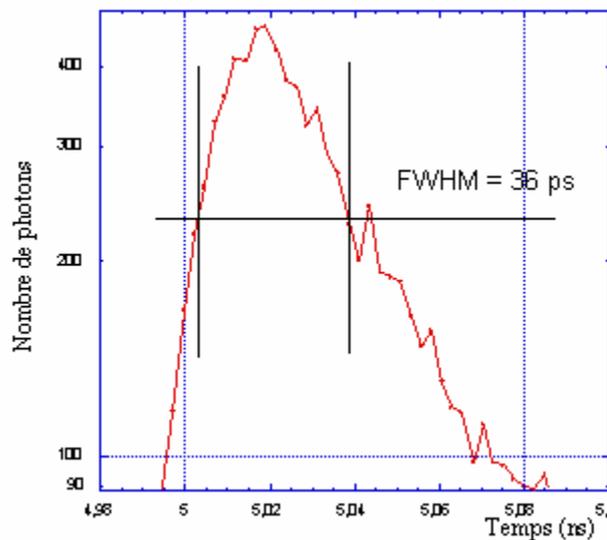
Pour effectuer cette mesure, deux solutions existent : mesurer la réflexion du laser, ce qui dans notre cas n'est pas possible, le détecteur étant protégé par un filtre BG39 bloquant le laser et le détecteur n'ayant lui-même aucune sensibilité au delà de 700 nm.

L'autre solution est d'observer un fluorophore ayant un temps de vie très court ou permettant la génération de seconde harmonique qui est un processus instantané. Notre choix s'est porté

sur l'acide picrique (2,4,6-trinitrophenol) dont le temps de vie est suffisamment court pour être négligé par rapport à la réponse de l'instrument.

Les acquisitions effectuées sur une solution saturante d'acide picrique réalisées à 790 nm fournissent une valeur de FWHM (Full Width at Half Maximum) comprise entre 28 et 36 ps (figure 36). Les mêmes valeurs ont été obtenues par mesures de génération de seconde harmonique réalisées sur des cristaux d'hydroxy-urée.

Le temps de réponse de l'instrument est donc largement suffisant pour les fluorochromes que nous souhaitons observer dont les temps de vie sont de l'ordre de quelques nanosecondes.



36: détail de la courbe de déclin de photon obtenue par excitation de l'acide picrique à 790 nm. La largeur à mi-hauteur (FWHM) mesurée est de 36 ps.

La mesure régulière de l'IRF du système est particulièrement importante car elle varie en fonction de modifications, même légères du système. Par exemple, un artefact régulièrement rencontré est la présence de pics multiples dans la courbe de réponse impulsionnelle. Cette dernière est souvent due à une réflexion parasite de la lumière entre deux lentilles ou deux filtres. Connaissant la vitesse de la lumière, on peut estimer qu'un délai de 1 ns entre deux pics correspond à une distance parcourue de 30 cm (soit 15 cm pour la réflexion si on compte l'aller retour de la lumière). Il est alors possible de localiser la zone où se produit la réflexion et de changer légèrement l'orientation de la pièce responsable. Ce type de réglage est particulièrement important car une deuxième excitation décalée donnera de mauvais déclin de fluorescence.

**(4) Mesures de temps de vie de fluorescence sur des échantillons standardisés :**

Nous avons ensuite mesuré le temps de vie de différentes solutions de référence aqueuses à savoir la fluorescéine, la rhodamine B et la rhodamine 6G. Les courbes obtenues ont été analysées suivant un modèle de déclin mono-exponentiel qui était le plus approprié au regard du  $\chi^2$  et de la forme des résidus. Les valeurs obtenues sont très proches de celles trouvées dans la littérature (tableau 1) et confirment la capacité de notre système à réaliser des mesures précises.

	Valeurs mesurées (ns)	Valeurs attendues (ns)	Référence
Fluorescéine	4.09	4.10	(73)
Rhodamine 6G	4.04	4.11	(74)
Rhodamine B	1.64	1.68	(75)

*Tableau 1: comparaison entre les temps de vie mesurés sur notre système et les valeurs trouvées dans la littérature.*

**(5) Reproductibilité du système :**

Nous avons effectué des mesures de temps de vie dans des conditions identiques sur des solutions de rhodamine 6G, en faisant varier :

- Le gain du détecteur
- La puissance laser
- La concentration de la solution dans l'eau
- Les réglages de la carte de comptage

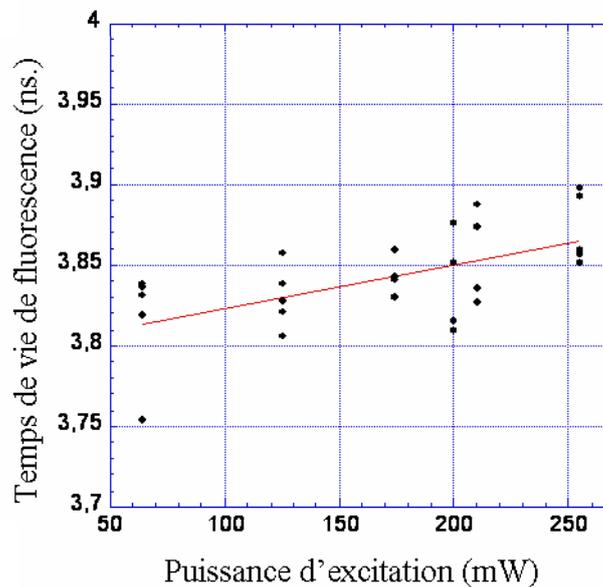
Nous avons trouvé un temps de vie de 4.021ns et un écart type de 4ps. Notre système présente donc une très bonne reproductibilité de mesures de temps de vie. Ces mesures ont été répétées régulièrement au cours de nos expériences et donnent des résultats identiques, confirmant également la stabilité de notre instrument au cours du temps.

ii) Conditions d'utilisation du système

(1) Détermination des conditions limites d'utilisation du système.

Nous avons ensuite voulu tester la qualité des mesures de temps de vie en fonction de différents paramètres d'acquisitions. Différentes mesures ont alors été effectuées sur des solutions de rhodamine 6G. Les acquisitions suivantes ont été réalisées sur des solutions de 3 ml, ce qui nous permet de négliger à la fois le photoblanchiment des fluorophores et l'évaporation occasionnée par le laser infrarouge.

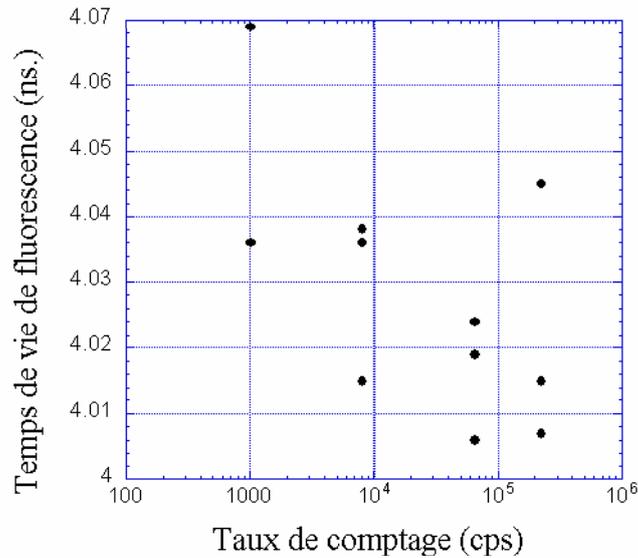
Nous avons tout d'abord testé l'effet de la **puissance laser** (figure 37)



37: temps de vie de la rhodamine 6g en fonction de la puissance d'excitation.

Le temps de vie mesuré augmente légèrement avec la puissance d'excitation (60ps). Cette variation est cependant négligeable par rapport à celles qui vont résulter de mesures réalisées en cellule. De plus, les puissances extrêmes ici mesurées sont incompatibles avec des mesures de temps de vie sur cellules vivantes. La puissance laser sera donc limitée pour assurer une invasivité minimale de nos cellules avant d'altérer de façon significative nos mesures de temps de vie.

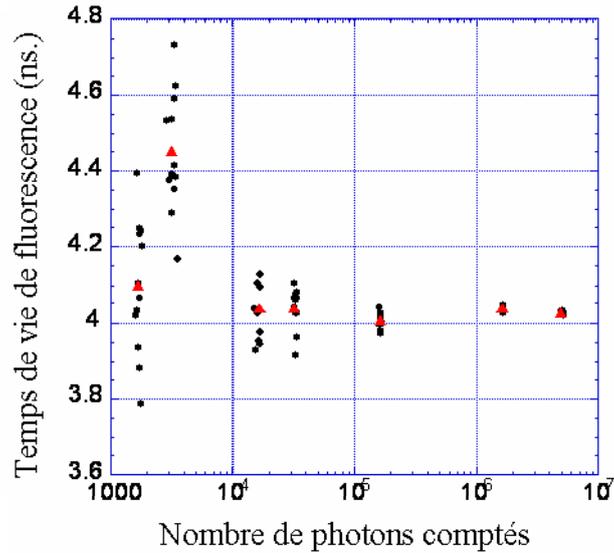
Nous avons ensuite fait varier le **taux de comptage** en jouant sur l'ouverture de l'iris positionné devant le détecteur afin de garder une concentration et une puissance constante (figure 38). Le nombre de photons total est également identique pour les différentes courbes grâce à des temps d'acquisitions variables.



38: temps de vie de la rhodamine 6g en fonction du taux de comptage

Nous observons ici une légère diminution du temps de vie pour les taux de comptage les plus élevés. Celle-ci reste faible pour les taux de comptage élevés et se dégradera sans doute nettement au delà de  $10^6$  photons/s. Le test a cependant été limité à  $2 \cdot 10^5$  pour éviter toute détérioration de la MCP

Le **nombre de photons total**, pour une acquisition comportant 1024 canaux temporels, permettant d'obtenir une bonne estimation de notre temps de vie a été évalué en changeant les temps de mesure (figure 39).

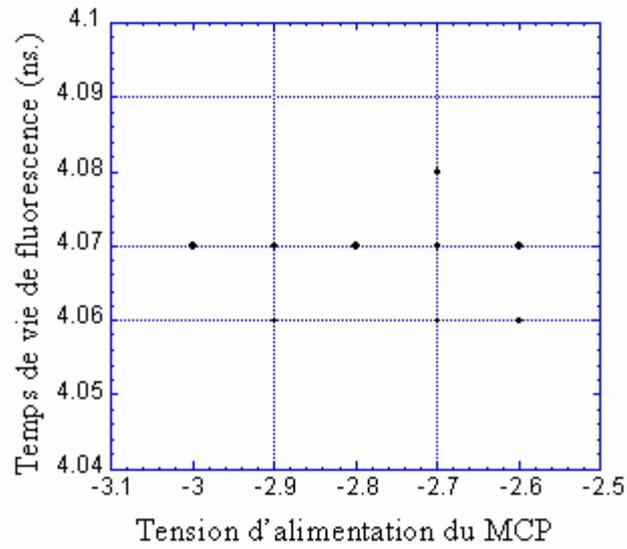


39: temps de vie de la rhodamine 6g en fonction du nombre de photons comptés

Nous voyons ici le niveau de précision et de reproductibilité de nos mesures de temps de vie en fonction du nombre de photons. A partir de 10<sup>4</sup> photons comptés, la mesure devient très précise et elle est parfaitement reproductible à partir de 10<sup>5</sup>. Malheureusement, ce taux de comptage est difficile à obtenir sur des cellules vivantes sans recourir à des temps d'exposition très longs, des puissances élevées ou des niveaux de surexpression de nos protéines très importants. La majorité des acquisitions se situent donc entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> photons, correspondant au meilleur compromis entre biologie et précision des mesures.

La MCP possède une alimentation haute tension et peut être alimentée entre -2500V et -3000V. Nous avons donc testé l'effet du gain sur les mesures de temps de vie tout en conservant un nombre de photons comptés et un taux de comptage homogène en ajustant l'ouverture de l'iris (figure 40)

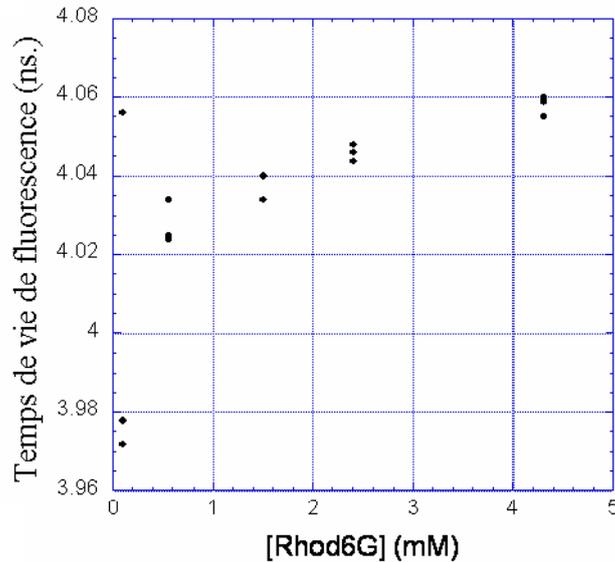
Comme spécifié par le constructeur, cette gamme de gain assure une bonne stabilité des mesures.



*40: temps de vie de la rhodamine 6g en fonction de la tension appliqués aux bornes de la MCP exprimée en kV.*

## (2) Effet de la concentration du fluorophore en solution

Des mesures de temps de vie à différentes concentrations de rhodamine 6G ont été effectuées sur la gamme 0.1 à 5mM (figure 41)



41: temps de vie de la rhodamine 6g en fonction de sa concentration

Une légère augmentation est visible pour les concentrations les plus élevées mais celle-ci est une fois encore négligeable dans notre contexte. Une forte dispersion des valeurs est également visible pour les concentrations les plus faibles. Cette dernière est due à une forte diminution du rapport signal sur bruit qui réduit la qualité de notre ajustement

## (3) Compétiteurs collisionnels ou « quenching » de fluorescence :

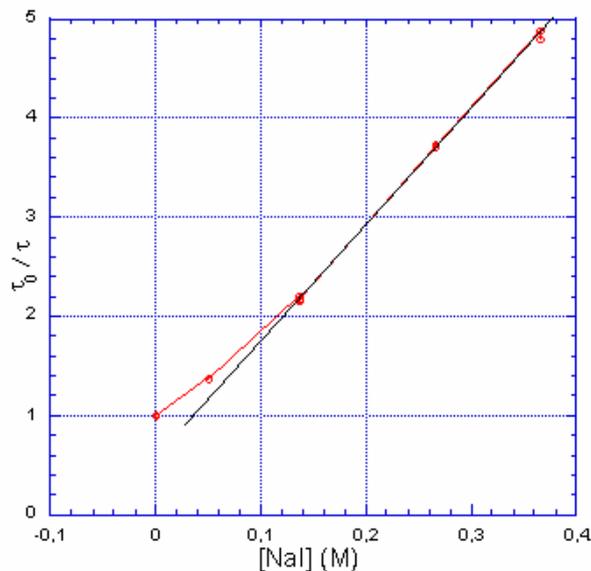
Nous avons réalisé des mesures sur la fluorescéine dont les ions  $I^-$  sont des compétiteurs collisionnels. Le temps de vie de cette dernière varie alors selon la loi de Stern-Volmer (76):

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad \text{Eq.10}$$

$\tau_0$  le temps de vie sans compétiteur,  $\tau$  le temps de vie,  $k_q$  le taux de compétition bimoléculaire,  $[Q]$  la concentration en compétiteurs, ici en ions  $I^-$

Il existe une dépendance linéaire entre  $\frac{\tau_0}{\tau}$  de la fluorescéine et la concentration en ions iodure.

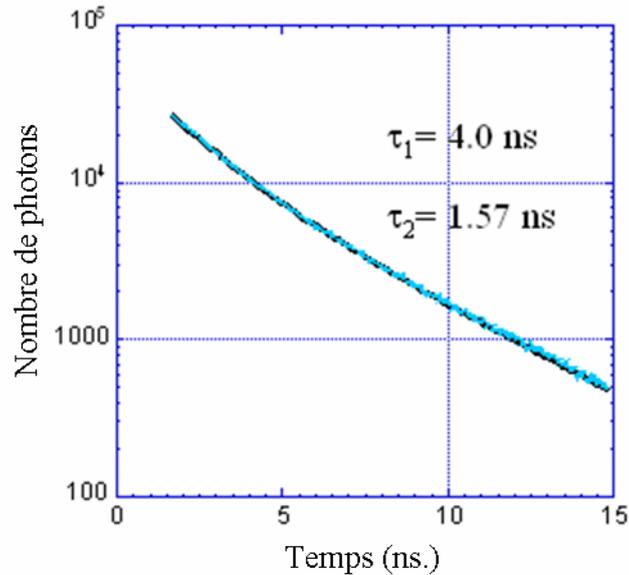
Nous avons réalisé des solutions de fluorescéine avec des concentrations variées en ions iodure afin de confirmer la linéarité de nos mesures sur une large plage de temps de vie (figure 42).



42: Ratio de temps de vie de fluorescence de la fluorescéine dans l'eau à différentes concentrations de Nal qui sert de compétiteur collisionnel.

#### ***(4) Mesures de temps de vie sur un mélange de deux espèces fluorescentes :***

Lors d'expériences en cellules, il est très courant de devoir rechercher différentes exponentielles dans une courbe de déclin. Nous avons donc testé la capacité de notre système à déterminer les valeurs du temps de vie de ces espèces. Pour cela, nous avons réalisé des mesures sur un mélange de 200nM de Rhodamine 6G et 100nM de Rhodamine B (figure 43). Les courbes obtenues ont été ajustées par un modèle bi-exponentiel sans contrainte et nous donnent des temps de vie de 4.02 +/- 0.04 ns et 1.57 +/- 0.03 ns, correspondant très précisément aux temps de vie mesurés de façon isolée pour ces deux solutions. Nous pouvons donc identifier clairement deux temps de vie différents pour deux fluorophores présentant des spectres de fluorescence proches à partir d'un seul déclin.



43: courbe de déclin d'un mélange de rhodamine B et 6G et temps de vie extraits.

### **(5) Mesures en cellules vivantes.**

L'objectif initial de notre système est de mesurer les interactions protéines/protéines dans la cellule vivante. Nous avons donc réalisé nos premières expériences de FRET sur deux systèmes biologiques modèles :

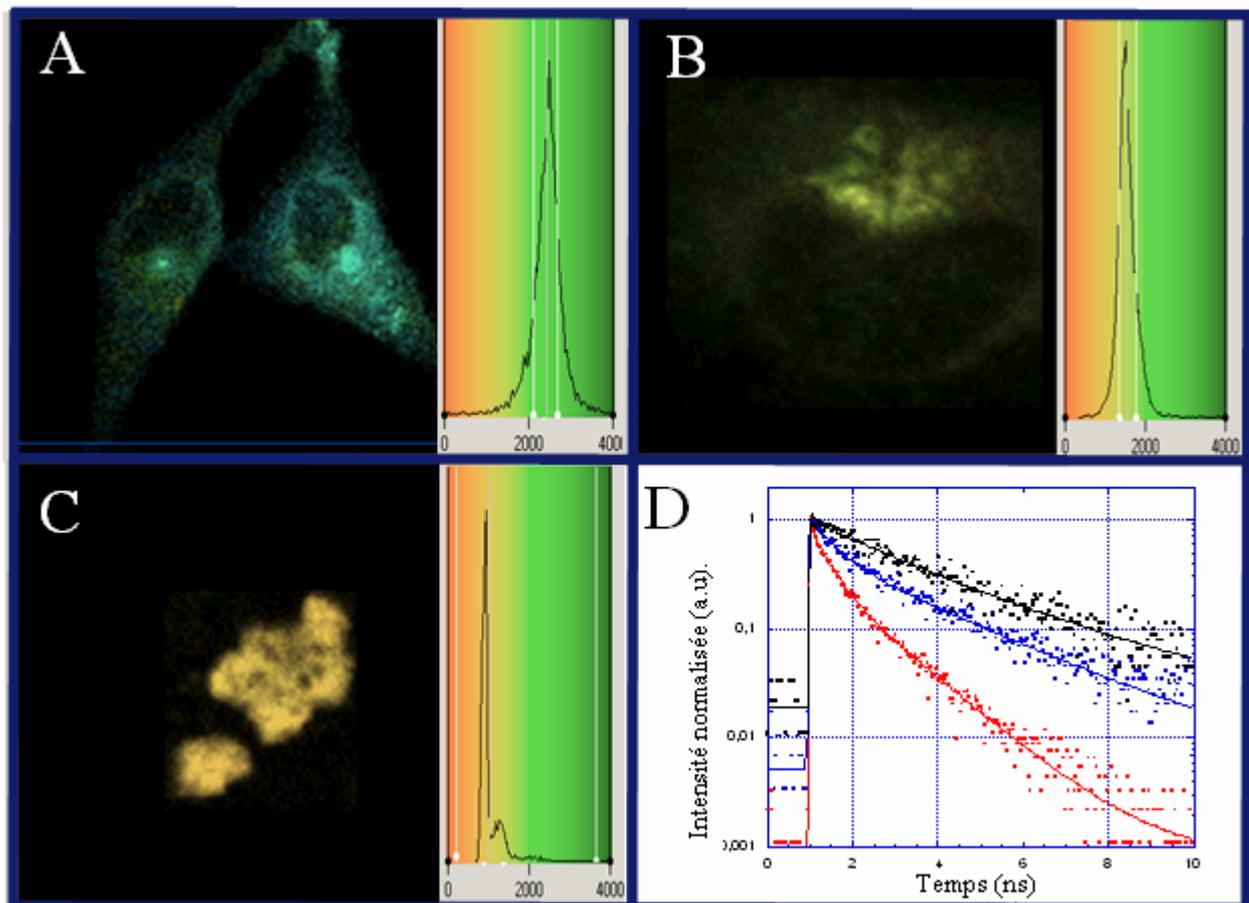
- Cellules HeLa exprimant une protéine « tandem » de CFP liée à la YFP par 6 acides aminés, qui constitue un témoin positif idéal pour ce couple de fluorophores.
- Cellules HeLa coexprimant une protéine de la famille des petites GTPases, Rab6a-CFP avec une forme recombinante d'AA2-YFP, connue pour interagir avec la forme GTP de Rab6A (77).

Nous avons également utilisé un témoin négatif de FRET pour calibrer notre expérience, à savoir Rab11-CFP également exprimée dans des cellules Hela.

La présence de témoins positifs et négatifs pour une expérience de FRET est un des facteurs fondamentaux dans l'estimation de la validité des résultats. En effet, comme nous en verrons différents exemples, de nombreux artefacts peuvent survenir et modifier le temps de vie apparent des espèces fluorescentes. Le principal de ces facteurs étant l'autofluorescence

cellulaire. Son niveau pouvant dépendre du stress subit par la cellule, il est fondamental de conserver des conditions d'acquisition induisant la même invasivité au niveau de nos cellules (puissances appliquées, temps d'acquisition, température de l'expérience, fraîcheur du milieu...). Les acquisitions effectuées tiennent compte de ces remarques (figure 44).

Nous obtenons alors un temps de vie moyen de  $2.4 \pm 0.1$  ns pour rab11-CFP seule et de 0.85ns pour le tandem CFP-YFP, ce qui nous donne les références minimum et maximum de FRET pour ce système cellulaire. Nous avons ensuite mesuré le temps de vie de Rab6a-CFP en présence d'AA2-YFP. Nous obtenons alors un temps de vie de  $1.5 \pm 0.1$  ns pour la CFP confirmant une fois encore la présence de FRET mais dans une moindre mesure que pour le tandem. Ce système de mesures de temps de vie est donc bien adapté aux études d'interactions moléculaires par FRET dans la cellule vivante.



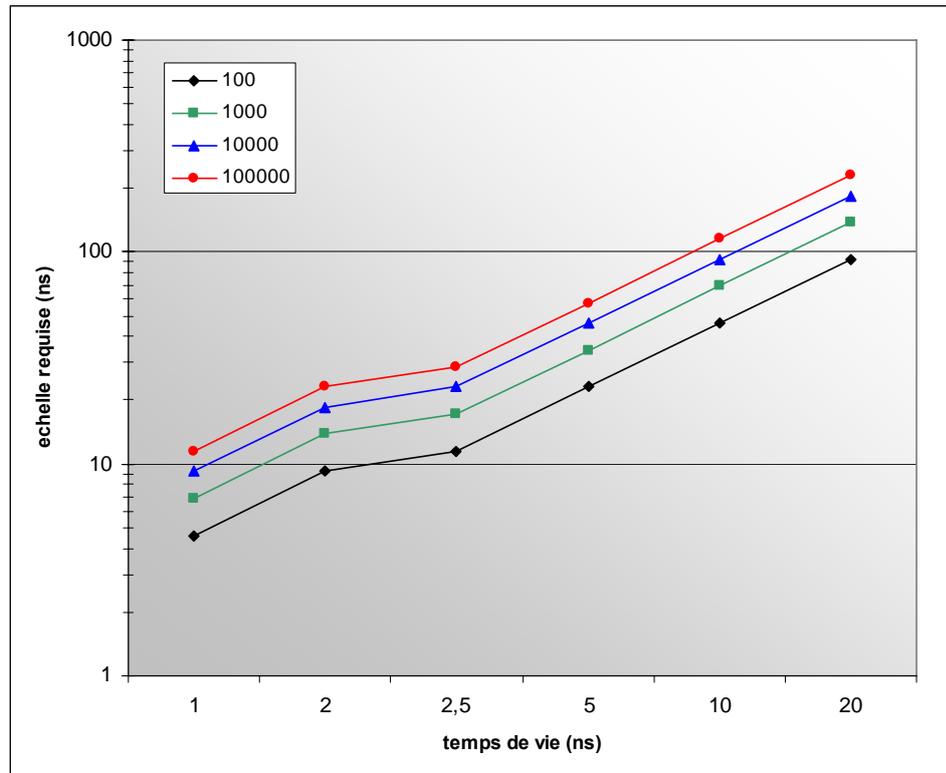
44 : expérience complète de FRET par mesures de FLIM en cellule HeLa vivante exprimant (A) rab11-CFP, (B) Rab6a-CFP et AA2-YFP, (C) CFP-YFP. D : courbe de déclin de photons normalisés aux maximums des échantillons présentés en A (noir), B (bleu) et C (rouge).

## **Section.2 Optimisations instrumentales :**

*Le système de mesures que nous avons présenté est déjà une version optimisée quant à sa précision et à sa reproductibilité par rapport aux systèmes commerciaux classiques. En particulier, l'utilisation d'un PMT de type MCP nous garanti une réponse instrumentale optimisée en comparaison des détecteurs classiquement utilisés i.e. 30ps contre 200ps de FWHM. L'évolution des modules de détection et d'excitation nous permet de franchir une étape supplémentaire dans la précision et la flexibilité des systèmes de mesures de temps de vie. Nous allons donc présenter ici différentes solutions que nous avons mises en œuvre et qui permettront de nouvelles applications comme l'utilisation des Qdots ou l'optimisation de la collection des photons.*

### **a Les sources d'excitation.**

Le laser Ti :Sa est un laser pulsé accordable en longueur d'onde et souple d'utilisation, ce qui permet d'exciter la CFP et la GFP qui sont les deux principaux donneurs dans les expériences de FRET. Il émet des pulses laser à une fréquence de 76MHz (fenêtre temporelle de 13ns) permettant de bonnes acquisitions pour des fluorophores ayant des temps de vie courts ou mono-exponentiels. Cette fenêtre temporelle devient cependant étroite dans les cas plus complexes et il devient alors difficile d'estimer précisément la pente de la fin du déclin. Ce problème devient encore plus critique dans l'étude de fluorophores à temps de vie long tels les « quantum dots ». La figure 45 donne la fenêtre temporelle théorique nécessaire en fonction du temps de vie mesuré et du nombre de photons maximum dans un canal temporel. Comme nous le voyons ici, même pour les fluorophores classiquement utilisés en biologie comme les variants GFP qui ont un temps de vie de l'ordre de 2.5ns, la fenêtre de 13ns du Ti :Sa ne nous permet que rarement de mesurer la totalité de la courbe de déclin. Nous avons donc testé différentes sources lasers à la recherche du meilleur compromis entre accordabilité et fréquence de travail.



45: fenêtre temporelle nécessaire pour mesurer un déclin complet en fonction du temps de vie de fluorescence et du nombre de photons maximum du déclin (compris entre 100 (noir) et 100000 (rouge) photons).

**i) Implémentation du « cavity dumper » sur le Ti :Sa**

L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec Dominique Dumas et Elisabeth Werkmeister, LEMTA CNRS UMR 7563, Nancy

**(1) Introduction :**

Différentes caractéristiques vont conditionner le choix d'une source d'excitation. Notre objectif était d'adapter la fréquence d'excitation à une étude de temps de vie sur des fluorophores aussi variés que les variants GFP ou les Qdots, et cela tout en continuant à utiliser une excitation bi-photonique la plus efficace possible. La solution la plus classique pour optimiser la fréquence d'excitation à l'échantillon mesuré est l'ajout d'un « pulse picker » qui réduira la fréquence en supprimant des pulses laser. Cette solution, bien qu'efficace, réduit fortement la puissance moyenne, ce qui peut devenir un obstacle à l'excitation bi-photonique, cette dernière nécessitant une concentration spatio-temporelle forte des photons. Une solution alternative pour réduire cette cadence de tir est l'utilisation d'un *cavity dumper*. Le principe du *cavity dumper* est basé sur un effet acousto-optique. Une modulation de la densité, et donc de l'indice de réfraction, est introduite dans un cristal approprié par l'application d'un signal acoustique haute fréquence. Ce cristal fonctionne alors comme un réseau optique en trois dimensions. Le faisceau laser le traversant peut alors être diffracté. Cette fréquence acoustique appliquée sur le cristal est générée grâce à l'application de radio fréquences (RF) sur un transducteur piézoélectrique fixé au cristal (l'ensemble est appelé cellule de Bragg). En utilisant des signaux RF brefs, il est alors possible de sélectionner des impulsions laser parmi le train d'impulsions et de les défléchir suivant le premier ordre de diffraction (figure 46).

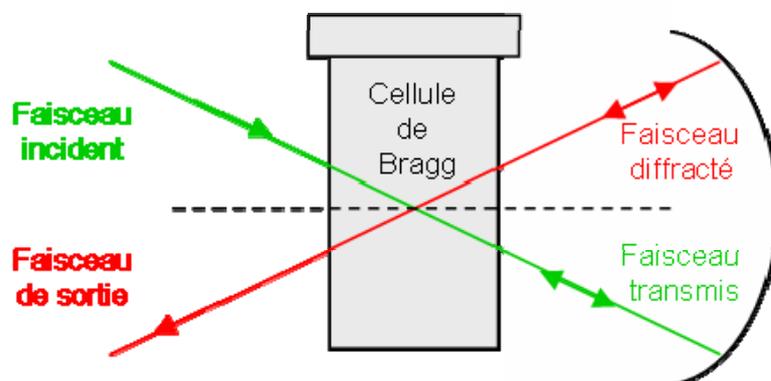
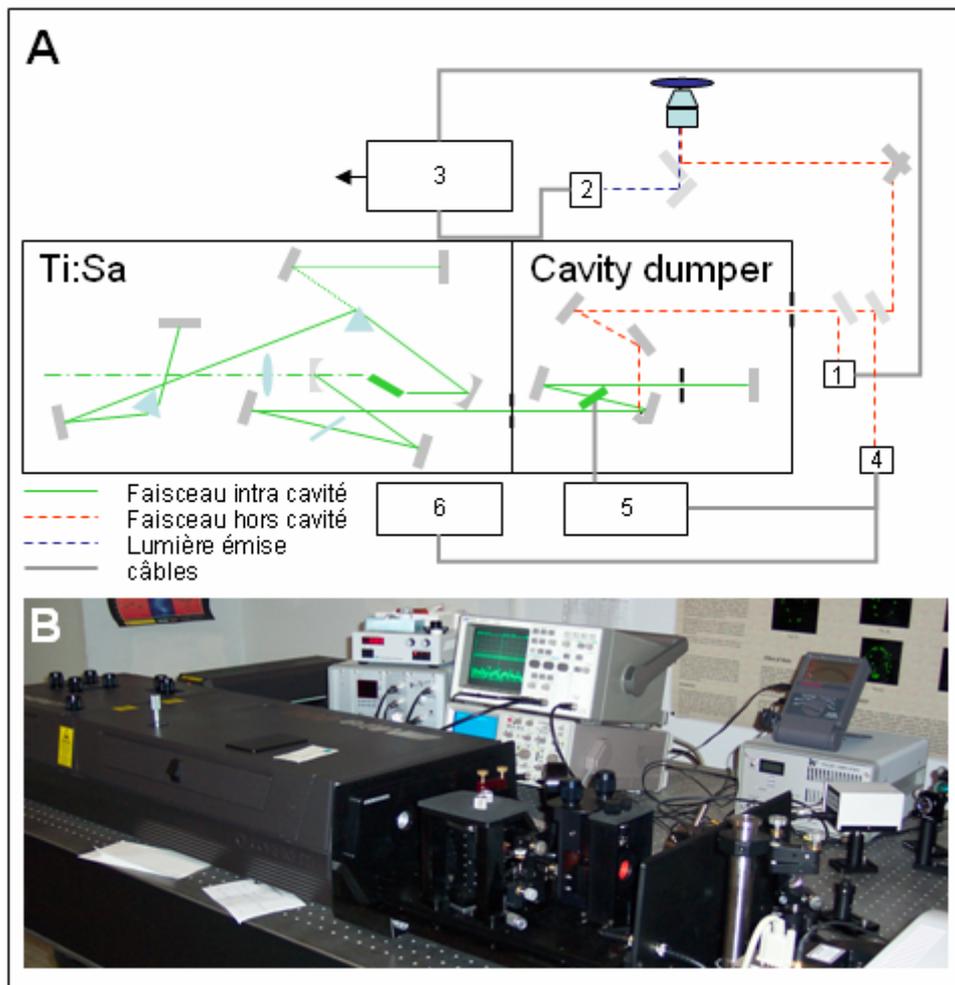


Figure 46: représentation schématique d'une cellule de Bragg utilisée dans un processus de « cavity dumping » à double passage.

## (2) Mise en place du système :

Pour tester cette alternative, nous avons utilisé le module *PulseSwitch* commercialisé par APE. Ce dernier est composé d'un module optique et de l'électronique de contrôle du signal RF appliqué sur la cellule de Bragg. Son installation se décompose en plusieurs étapes. Il faut tout d'abord retirer la fente de sortie du MIRA900-F qui sera placée en sortie du *cavity dumper*. On retire également le miroir de fond de cavité et la fenêtre permettant d'éviter un retour du laser dans la cavité (fenêtre de Brewster). On adapte ensuite le système de renvoi vers la diode de synchronisation afin de le rendre compatible avec la nouvelle puissance intra cavité. L'ensemble de ces opérations prend entre 1 et 2 heures pour un utilisateur expérimenté. L'ensemble de notre système d'excitation est présenté sur la figure suivante.



47: Système d'excitation composé du laser MIRA900, d'un système cavity dumper et du système de couplage optique.

*A*, schéma optique simplifié de la chaîne d'excitation. Les triangles bleus sont des prismes, les ovales bleus des lentilles, les rectangles gris des surfaces réfléchissantes. (1) la diode de synchronisation, (2) le détecteur, (3) la carte de comptage de photons, (4) l'analyseur de spectre, (5) système de contrôle RF, (6) oscilloscope.

*B*, photographie du laser Ti :Sa couplé au système cavity dumper (partie ouverte)

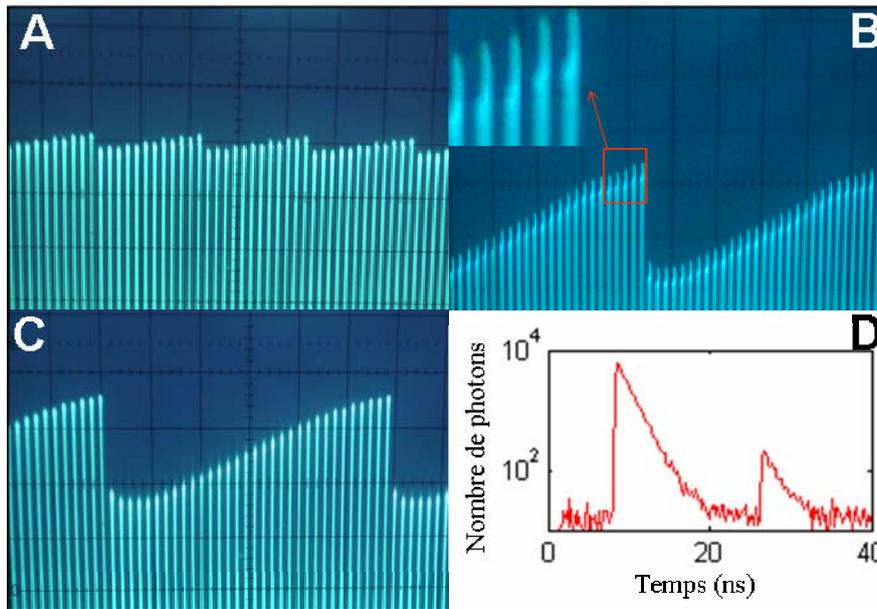
Une fois le système installé, il faut tout d'abord optimiser la puissance de sortie en ajustant la position des miroirs de fond de cavité et la position de la fente de sortie après avoir mis le laser en mode continu et éteint la RF. Cette étape nous garantit une bonne stabilité du système et évite d'obtenir des doublets d'impulsion. On ajuste ensuite la position et l'orientation de la cellule de Bragg avant d'allumer le système de RF et de « mode-locker » le laser. Cette étape nous garantit une entrée à l'angle de Brewster dans la cellule de Bragg, la puissance laser étant maximale à cet angle. Le système de RF étant mis en marche, nous allons pouvoir sélectionner la fréquence de sortie en ajustant le DR (Division ratio) à la valeur souhaitée.

Pour obtenir un train d'impulsion optimal, différents éléments de contrôle du RF devront être ajustés :

- la largeur temporelle d'une impulsion RF.
- la différence de phase entre la RF et le signal de synchronisation provenant de la diode interne du laser.
- La puissance de la RF.

L'objectif de ces différents réglages sera d'obtenir une puissance de sortie maximale, un contraste élevé entre les différentes impulsions et d'éviter les doubles impulsions. La figure suivante présente différentes configurations de trains d'impulsions intra cavité.

La figure 48 A. présente un réglage dont le contraste des impulsions est très faible, résultant en une puissance de sortie faible. Le réglage présenté en B est cependant plus problématique. En effet, le train d'impulsions est constitué d'impulsions doubles légèrement décalées dans le temps. Il en résultera une double excitation de l'échantillon à des temps différents. Les courbes de déclin mesurées seront alors du type de celles observées en D et donc le plus souvent inutilisables. La configuration présentée en C correspond à un réglage correct de la RF présentant un fort ratio d'amplitude au sein du train d'impulsions, lui-même exempt de doubles impulsions.

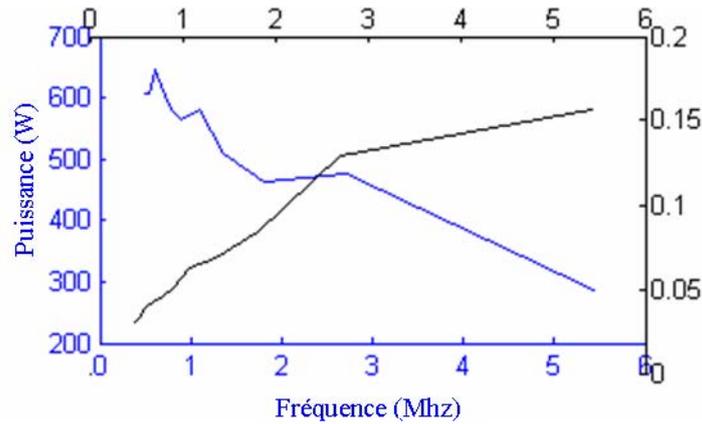


48. **A-C** : photographie de différents trains d'impulsions intracavité mesurés par l'oscilloscope lié à la diode de synchronisation interne du laser avec en x le temps (100ns/divisions) et en y l'amplitude (AU)  
**D** : mesures de temps de vie consécutives au réglage de RF présenté en B (voir le texte pour plus de détails.)

### (3) Caractérisation du système.

Le système étant spécifié pour un DR compris entre 2 et 260000, nous avons voulu déterminer les fréquences qu'il est possible d'obtenir en conditions réelles d'utilisation. Après optimisation des réglages, le système se révèle être adapté pour des DR compris entre 5 et 110, correspondant à des fréquences comprises entre 10.8 MHz et 49.1 kHz. En dessous de ce DR, le système devient fortement instable, ce dernier n'étant plus capable de défléchir les impulsions suffisamment rapidement. Au dessus de cette limite, la puissance de sortie devient trop faible pour obtenir un effet d'excitation à deux photons satisfaisant.

Cette fenêtre de fréquences est cependant suffisante pour la majorité de nos applications biologiques (voir figure 45). La puissance de sortie pour ces différentes fréquences a été mesurée. Les résultats obtenus sont présentés figure 49.



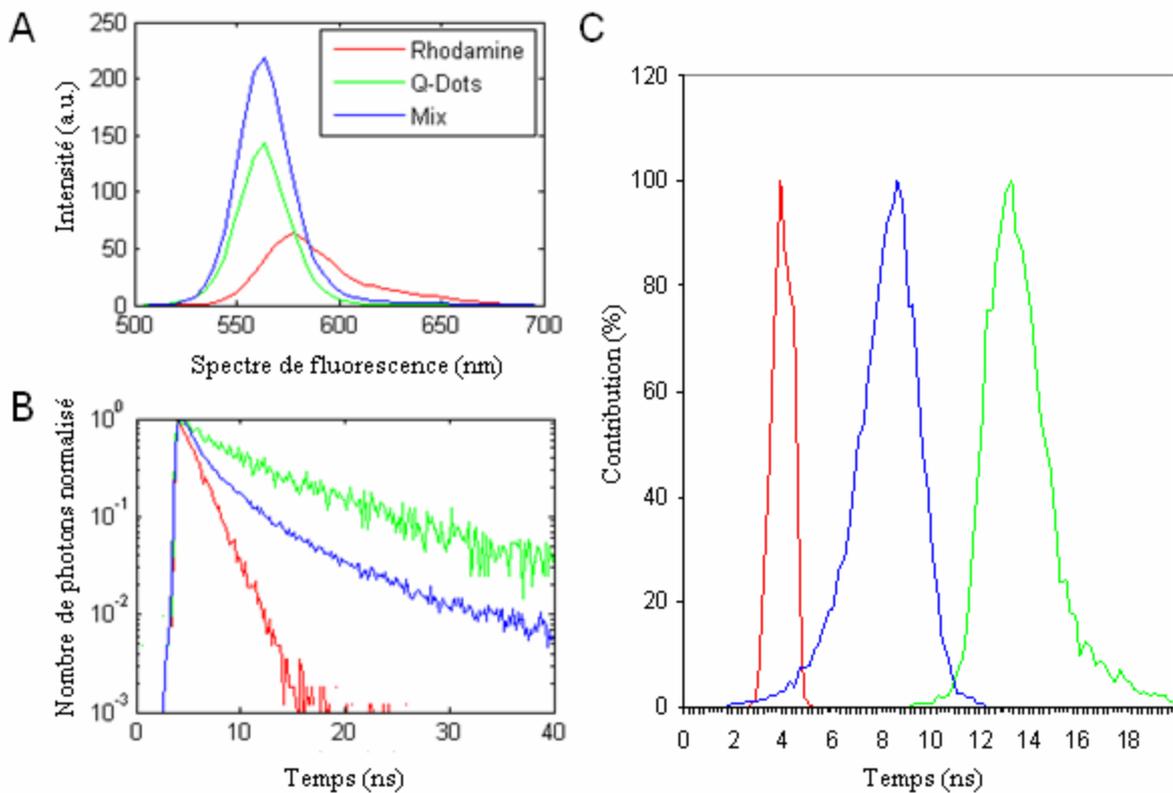
49: puissance moyenne du faisceau laser mesurée en sortie de cavité (mW, noir) et approximation de la puissance crête (mW, bleu) considérant les impulsions comme ayant une enveloppe carrée. ( $\lambda=810\text{nm}$ )

Comme nous le voyons, la puissance moyenne est réduite par l'augmentation du DR (i.e. pour les fréquences les plus faibles.), la puissance crête, quant à elle reste dans tous les cas très élevée.

Nous avons ensuite évalué et caractérisé ce système sur des solutions de fluorophores de temps de vie connus. A cet effet, nous avons entrepris des mesures sur deux types de solutions:

- A base de rhodamines, qui nous ont permis de calibrer le système avant implémentation du *cavity dumper* et qui constituent une référence idéale pour les temps de vie de l'ordre de la nanoseconde
- A base de Quantum Dots. Un des objectifs de l'extension de la gamme de fréquence étant la mesure de temps de vie des Qdots, il était indispensable de tester notre capacité de mesure sur ce type de fluorophores à temps de vie long.

Nous avons choisi la rhodamine 6G et une solution de Qdots dont le maximum d'émission se situe à 565nm (Qdots-565), ces deux chromophores étant difficilement séparables par leurs caractéristiques spectrales mais ayant des temps de vie très différents. Les résultats obtenus sont présentés figure 50. Comme nous le voyons, il est très aisé de séparer ces deux solutions en utilisant leurs caractéristiques de temps de vie, l'ajustement des courbes ayant été réalisé en laissant libres tous les paramètres d'ajustement. La possibilité de mesurer des temps de vie sur des échelles temporelles larges nous offre donc une dimension complémentaire au spectre de fluorescence et ouvre ainsi des perspectives intéressantes quand au multi marquage cellulaire.



50: mesures réalisées sur une solution de rhodamine 6G (rouge), de Qdots-565 (vert) et du mélange de ces deux solutions (bleu)

A: spectre de fluorescence

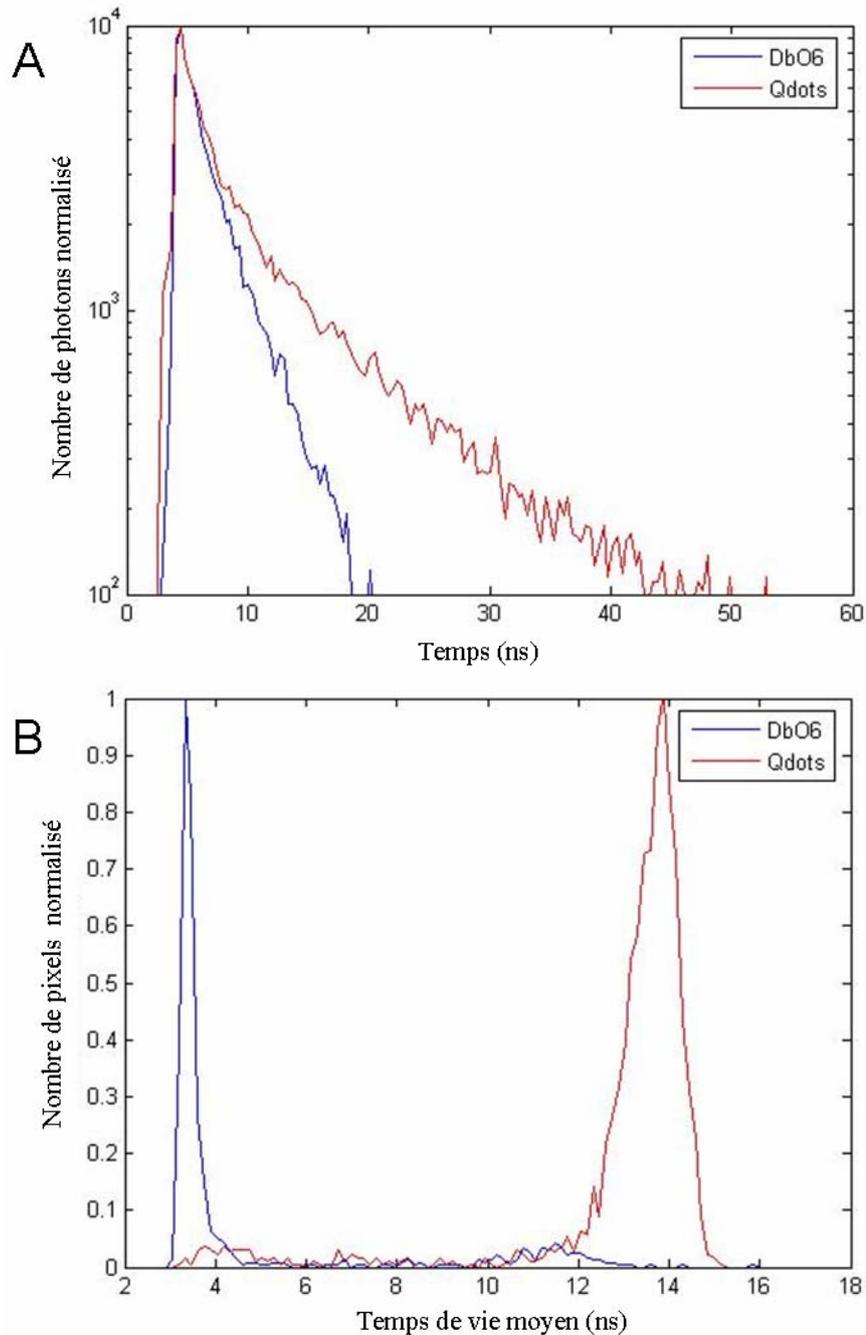
B : courbe de déclin de photons.

C : distribution des valeurs de temps de vie extraites de chaque pixel d'une image de FLIM

Dans un deuxième temps, nous avons entrepris ce même type de mesures dans un contexte cellulaire. Nous avons utilisé deux marqueurs :

- Le DioC6 (dihexaocarbocyanine iodide) adressé au niveau du réticulum endoplasmique, des mitochondries et de l'enveloppe nucléaire ( $\tau \sim 3.5$  ns)
- Les Qdots-525-streptavidine liée à la Phalloïdine-Biotine qui marquent spécifiquement le cytosquelette ( $\tau \sim 14$  ns)

Nous avons alors réalisé des images de temps de vie de ces cellules que nous avons analysées grâce à un modèle de décroissance bi-exponentielle. La distribution des temps de vie obtenus pour chaque pixel est présentée figure suivante.



51: mesures réalisées sur une cellule marquée au DioC6 (bleu) ou comarques DioC6/Qdots-525 (voir le texte pour plus de détails.)

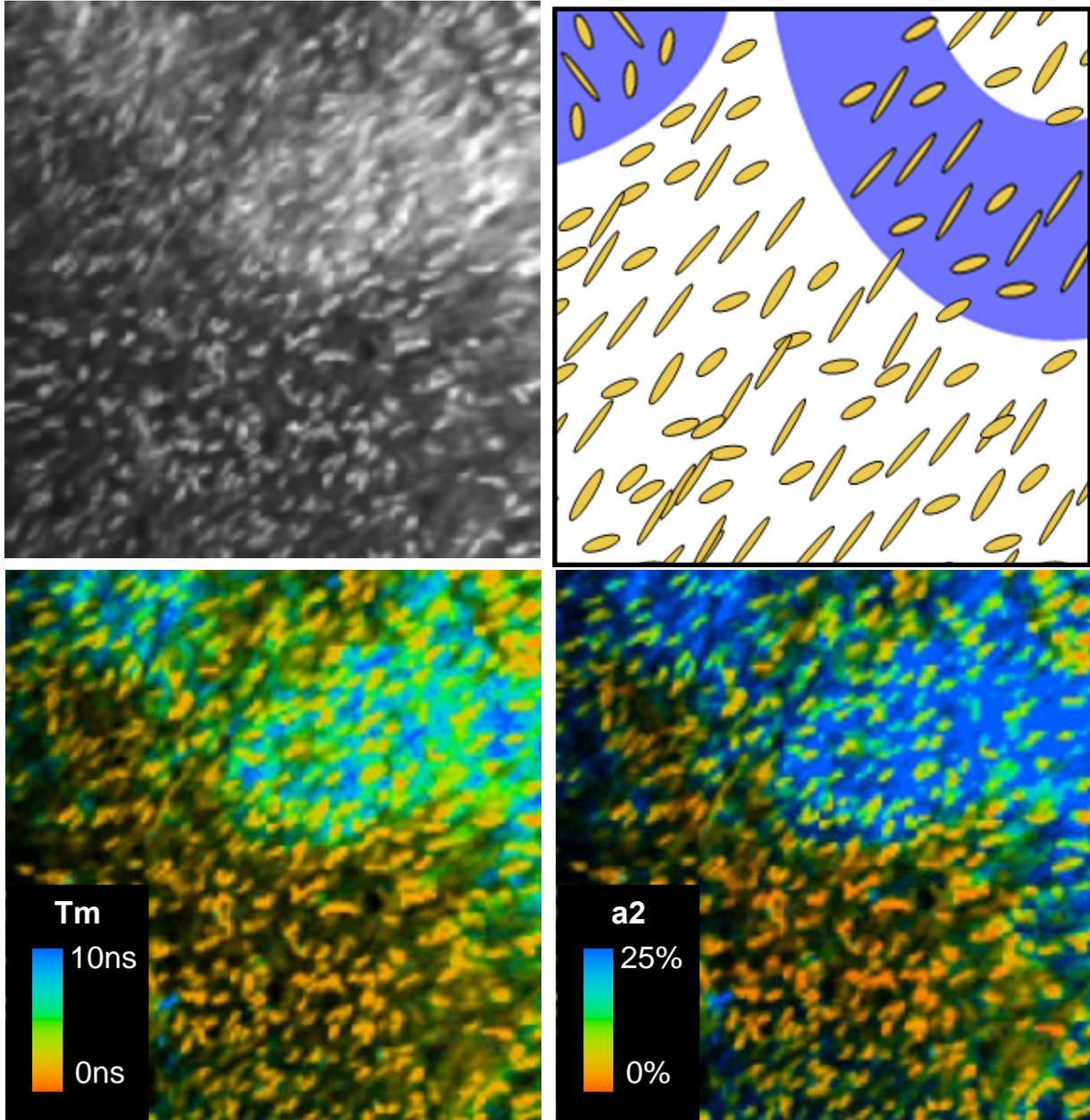
**A** : déclin normalisé

**B** : distribution des temps de vie mesurés pour chaque pixel d'une image de FLIM.

Nous avons enfin testé notre système d'acquisition sur des tissus épais. Notre source laser permet de réaliser une excitation à des profondeurs comparables à celle d'un laser infrarouge classique. Il est donc possible de réaliser des images à une profondeur de l'ordre de

quelques centaines de micromètres, cette valeur étant très variable en fonction du type de tissu observé.

La figure suivante présente une acquisition réalisée sur une artère de lapin. Les noyaux y sont marqués au Hoechst ( $\tau \sim 1.5\text{ns}$ ) et des Qdots-525-streptavidine ( $\tau \sim 14\text{ns}$ ) ont également été introduits.



52: étude d'une artère de lapin. Les noyaux des cellules ont été marqués au Hoechst et le cytosquelette par des Qdots-525-streptavidine. Les images de déclin de fluorescence ont été analysées en utilisant un modèle d'ajustement à 2 exponentielles.

**A** : image d'intensité de fluorescence

**B** : représentation schématique de l'échantillon avec en bleu, la zone dense correspondant à l'artère et en jaune, les noyaux des cellules.

**C** : image des temps de vie moyens

**D** : proportion de la contribution de la deuxième espèce exponentielle correspondant à la fluorescence émise par les Qdots.

L'imagerie de temps de vie permet d'obtenir un excellent contraste entre les compartiments marqués. Au regard de la large distribution des temps de vie obtenus pour chaque espèce et de l'écart important entre les deux distributions, la représentation des contributions relatives des deux espèces fluorescentes présentes permet d'accéder directement à leur localisation dans l'échantillon.

En conclusion, le système Ti :Sa couplé à un *cavity dumper* peut facilement être appliqué à des études en cellules ou en tissus. Son utilisation reste cependant réservée à des expérimentateurs confirmés de par la complexité des réglages permettant une excitation compatible avec les études de temps de vie et dont la longueur d'onde et la fréquence correspondent aux spécifications liées à l'expérience.

***ii) Implémentation du t-Pulse accompagné du module de dispersion spectrale.***

Les lasers femtoseconde de la série *t-Pulse* (Amplitude Systemes) tirent parti d'une nouvelle génération de matériaux lasers dopés à l'ion Ytterbium. Les matériaux dopés Ytterbium peuvent être directement pompés par diodes, ce qui permet de s'affranchir des lasers de pompes intermédiaires typiques des lasers titane:saphir. Il en résulte une grande compacité et fiabilité naturelle. Ces lasers délivrent des impulsions de forte énergie et de courte durée, avec une puissance lumineuse élevée. La longueur d'onde d'émission se situe dans le proche infrarouge (78). Nous avons testé le *t-Pulse 20* qui permet une excitation pulsée femtoseconde à une fréquence de 50MHz pour une puissance de sortie de 1W à 1030 nm.

Cette fréquence est particulièrement adaptée à des mesures de temps de vie de l'ordre de quelques nanosecondes (figure 45). Elle permet d'observer la totalité du déclin pour un nombre de photons comptés classique en biologie tout en ne limitant pas la fréquence de comptage maximum (effets de pile-up).

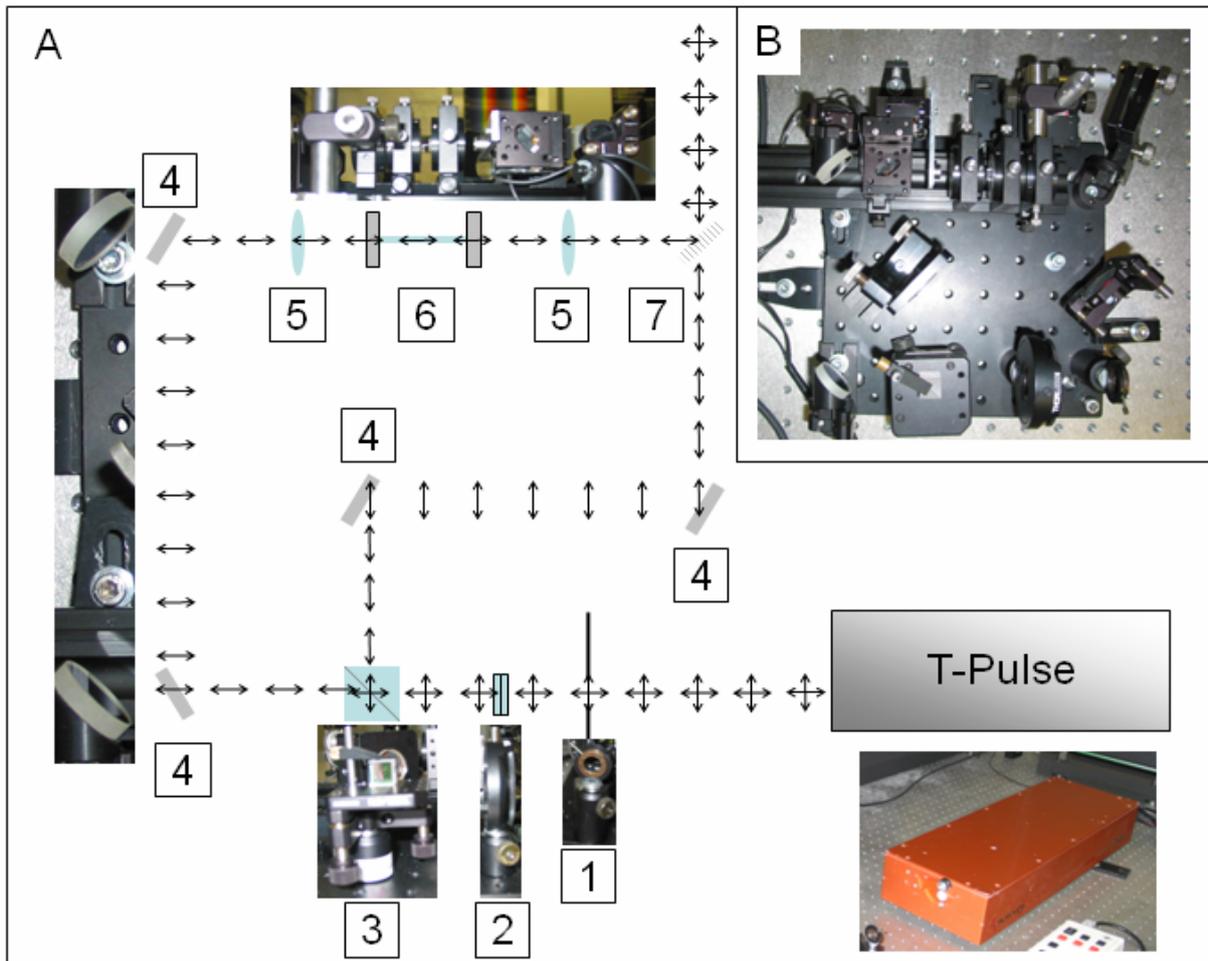
La longueur d'onde d'excitation à 1030 nm n'est cependant pas idéale pour les études de FRET utilisant les couples CFP/YFP ou GFP/DsRed et leurs variants :

- Dans le premiers cas, elle ne permet tout simplement pas d'exciter la CFP.
- Dans le deuxième cas, elle induit une forte excitation de la DsRed en plus de l'excitation de la GFP (ex : eGFP, ex max 488nm et DsRed-Monomer, ex max 556nm)

De plus, les microscopes commerciaux n'ont pas une optique adaptée pour des longueurs d'ondes supérieures à 1 $\mu$ m

Pour contourner ce problème, il est possible d'élargir le spectre d'émission en associant à la source une fibre optique à cristaux photoniques. En effet, l'injection d'une impulsion ultra brève dans une fibre classique va entraîner un élargissement spectral, notamment par automodulation de phase. Cependant, cette dispersion est associée à un élargissement de la durée d'impulsion. Les fibres à cristaux photoniques à dispersion intrinsèque nulle vont permettre d'obtenir cette dispersion spectrale sans dispersion temporelle associée.

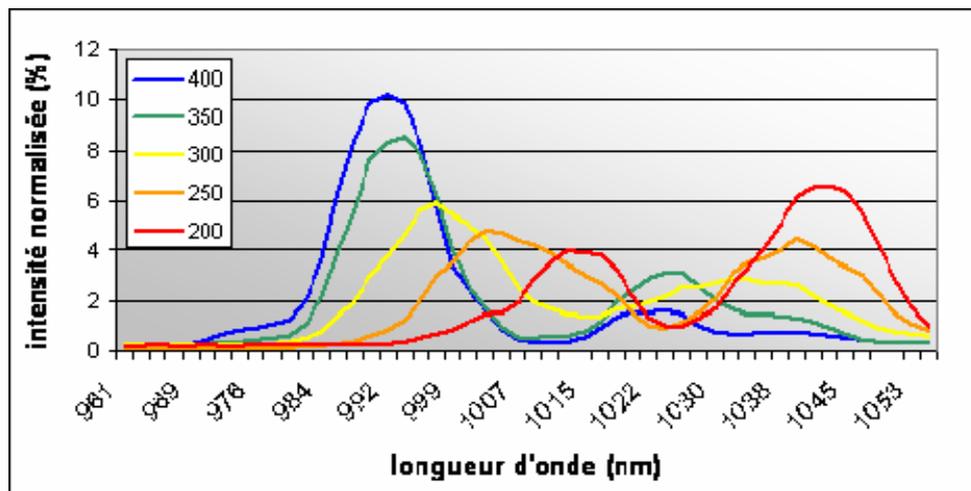
Pour tester cette solution, nous avons implémenté et caractérisé un prototype développé par la société *Amplitude Systemes* (figure 53) incluant ce type de fibre.



53: Schéma du système de dispersion spectral associé au t-Pulse (A) et photographie du système (B). Voir le texte pour plus de détails.

Ce prototype est composé d'un *pinhole* d'entrée (1), d'une lame  $\lambda/2$  (2) qui oriente la polarisation du faisceau laser et d'un cube séparateur de polarisation (3) qui règle la puissance laser en entrée de fibre. La combinaison de ces deux éléments va également permettre de diriger le faisceau vers deux systèmes optiques différents. Le premier utilise un jeu de miroirs (4) pour amener le faisceau directement en sortie de boîte au niveau d'un miroir *flip-flop* (7) grâce auquel toute la puissance laser peut être utilisée sans dispersion spectrale. Le deuxième focalise le faisceau grâce à des lentilles (5) dans la fibre (6) pour obtenir un continuum en sortie de boîte. Les deux faisceaux ont été ajustés de façon colinéaire. Ils sont alors tous deux amenés au niveau de l'entrée infrarouge du scanner par le même trajet optique comportant des miroirs adaptés pour l'utilisation de sources infrarouges.

Une fois la mise en place effectuée, nous avons caractérisé le profil spectral en fonction de la puissance injectée dans la fibre. Pour ce faire, nous avons utilisé le mode acquisition spectrale du logiciel LCS et réalisé des mesures sur des cristaux d'hydroxy-urée qui permettent une génération de seconde harmonique dont le rayonnement présente une longueur d'onde exactement égale à la moitié de la longueur d'onde d'excitation. Nous avons alors obtenu les résultats suivants (figure 54).

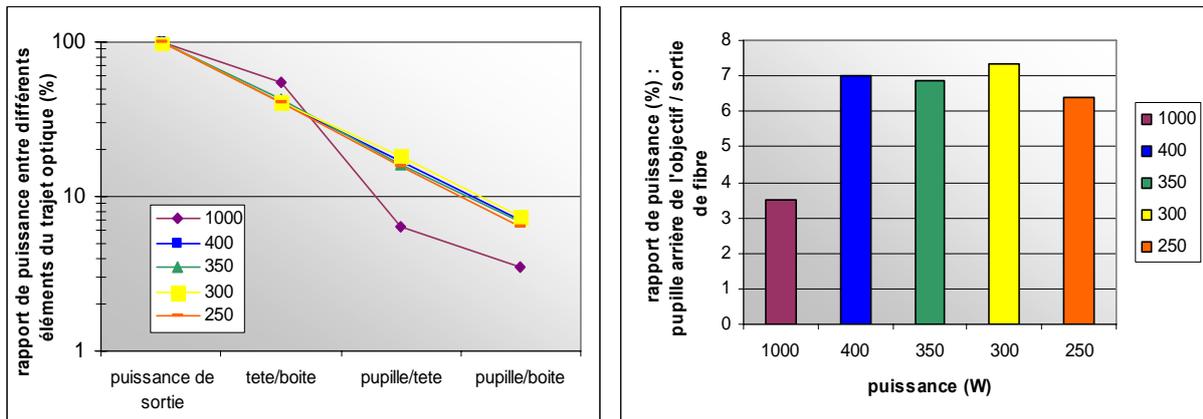


54: spectre du faisceau émis en fonction de la puissance de sortie de fibre (mW)

La fibre que nous avons utilisée permet une dispersion comprise entre 953 à 1050 nm en fonction de la puissance d'entrée dans la fibre. L'utilisation d'un filtre passe-bande adapté permet alors de choisir la gamme d'excitation voulue. Cette dispersion spectrale étant fortement dépendante de la puissance d'entrée de fibre, il est particulièrement important de contrôler la précision et la stabilité de cet alignement au début de chaque expérience.

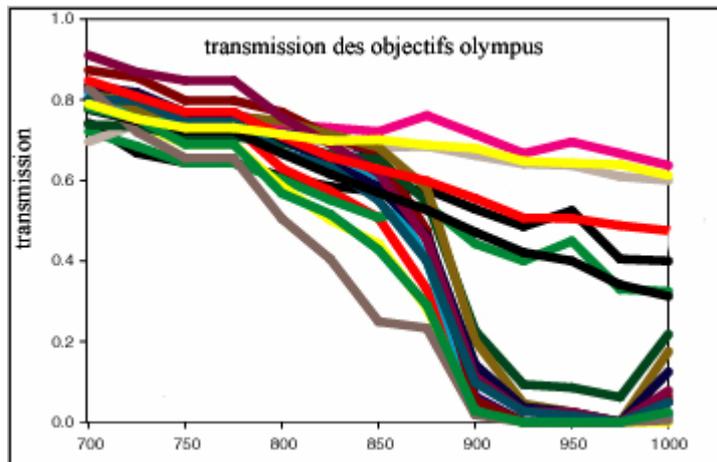
Il est important de noter que la dispersion spectrale obtenue grâce à ce type de fibre est fortement dépendante de la longueur de ladite fibre. Nous avons eu l'occasion de tester des dispositifs utilisant des fibres de tailles variables au cours de différentes écoles et démonstrations. Le profil spectral obtenu présente des distributions comparables pouvant être décalées sur une échelle spectrale plus large.

Le système confocal n'étant pas optimisé pour une excitation infrarouge, nous avons voulu quantifier les pertes de puissance aux différents points clefs du trajet optique (figure 55).



55: mesure du pourcentage de puissance laser transmise pour différentes puissances de sortie, et donc, différentes dispersions spectrales. A gauche, pourcentage de transmission aux différents niveaux de notre système. A droite, rapport entre la puissance de sortie de la tête de couplage et la pupille arrière de l'objectif.

Comme attendue, la perte de puissance entre le faisceau initial et l'échantillon est très importante, de l'ordre de 95%. La cause principale de cette perte est le miroir d'entrée du scanner (new focus, réf.5152), ce dernier étant spécifié pour une réflexion à 99% entre 700 et 900nm. La puissance appliquée à l'échantillon sera donc très faible, d'autant plus que les objectifs utilisés ne sont pas spécifiés pour une transmission optimale dans l'infrarouge (exemple de transmission figure 56).



56 : exemple de courbes de transmission de différents objectifs Olympus entre 700nm et 1000nm (données tirées du travail de recherche du laboratoire DRBIO : <http://www.drbio.cornell.edu>)

Comme nous le verrons, cette puissance laser reste cependant suffisante pour réaliser une excitation bi-photonique. Pour calibrer les mesures de temps de vie en utilisant ce système nous avons d'abord réalisé ces mesures sur des solutions aqueuses de rhodamine B et 6G en utilisant les différentes sources pulsées à notre disposition :

- Le laser titane : saphir (980 nm)
- La source *t-Pulse* (1030nm)
- La source *t-Pulse* après passage dans la fibre (puissance de sortie de fibre, 350mW)

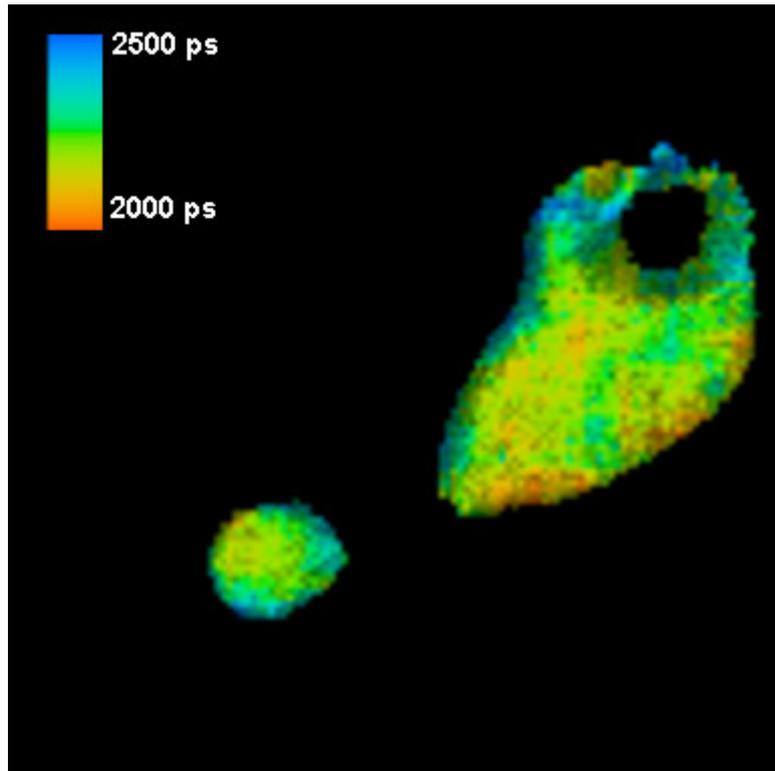
Les temps de vie mesurés grâce à ces différentes sources d'excitation sont rigoureusement identiques aux imprécisions de mesure près. L'utilisation de la fibre ne perturbe donc pas les mesures de temps de vie.

L'objectif de nos études étant de réaliser des mesures de temps de vie pour les études d'interactions moléculaires dans la cellule, nous avons voulu tester l'utilisation du système de dispersion dans ce contexte. Pour ce faire, nous avons réalisé des mesures de temps de vie dans des cellules neuronales exprimant la protéine GABA<sub>B1</sub>-eGFP après fixation.

L'excitation a été réalisée en réglant la puissance de sortie de fibre à 350mW. Cette valeur est le meilleur compromis entre puissance de sortie, rendement quantique de la eGFP et stabilité de la fibre. La figure 57 donne un exemple d'image obtenue. Comme attendu, la plage temporelle permet d'obtenir la totalité de l'information de déclin et facilite l'ajustement des courbes.

La faible puissance d'excitation nécessitera cependant des conditions d'acquisition dédiées :

- L'utilisation de cellules fortement transfectées, solution peu optimale car elle transforme profondément l'environnement naturel de la protéine marquée.
- Utilisation de temps d'accumulation long (>10mn) ou de moyennage spatial important.
- Imagerie deux photons permettant de sélectionner des zones d'intérêt et d'accumuler la totalité des photons provenant de ces zones en un seul déclin.



57: image de temps de vie d'une cellule neuronale exprimant la protéine  $GABA_{BI}$ -eGFP pour une puissance de sortie de fibre de 350mW.

***iii) Perspectives : autres sources d'excitation possibles.***

Nous avons vu dans les paragraphes précédents différentes solutions pour l'optimisation de l'excitation bi-photonique. Malheureusement, chacune de ces sources présente des limites.

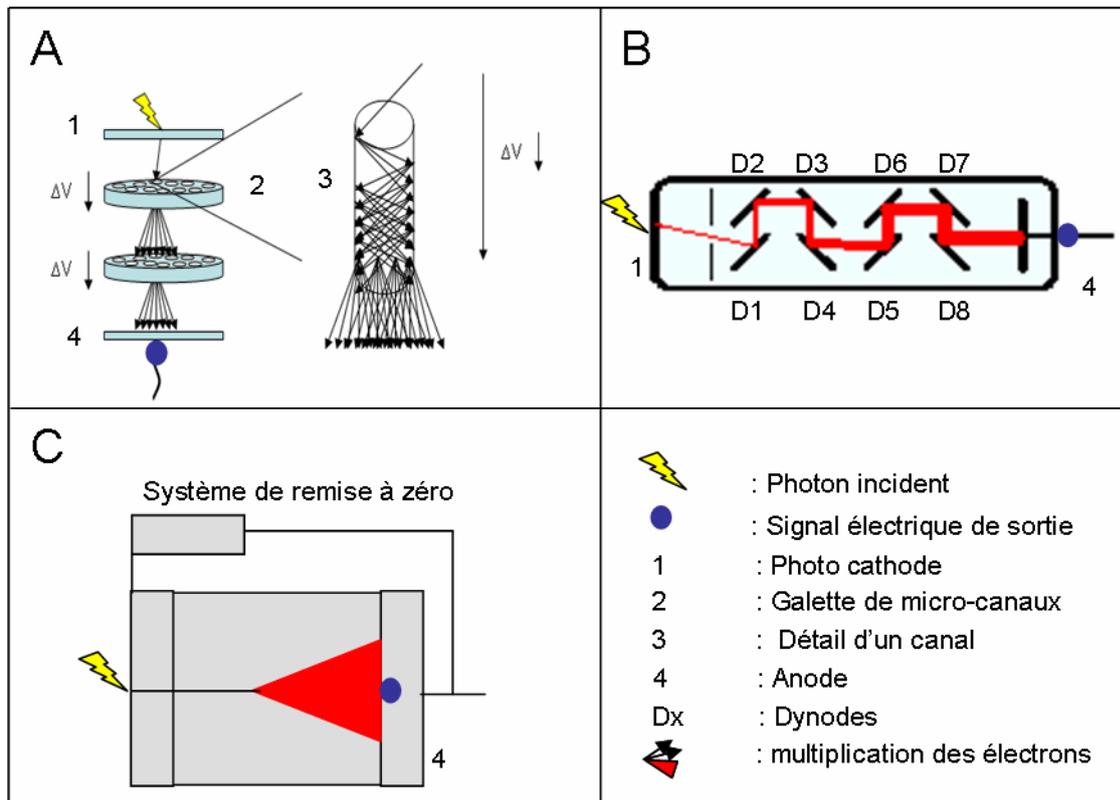
- Le Ti :Sa équipé d'un *cavity dumper* permet une adaptation de la longueur d'onde d'excitation à l'échantillon observé. Il ne fonctionne cependant pas de façon stable avec des DR inférieurs à 20, ce qui correspond à une fréquence d'excitation de l'ordre de 2MHz et limite donc la fréquence d'observation à 20kHz. Les temps d'acquisition pour obtenir une image de temps de vie de bonne qualité deviennent donc très élevés. Son utilisation sera donc optimale pour les acquisitions réalisées sur les fluorophores à temps de vie long, comme les Qdots, ou pour les acquisitions positionnées dans la cellule.
- Le *t-Pulse* présente une fréquence idéale pour les observations des variants GFP, mais reste mal adapté aux couplages avec le Leica SP2 de par sa longueur d'onde d'émission. Le couplage à une fibre de génération de continuum lumineux permet de résoudre en partie ce problème tout en augmentant la gamme de fluorophores observables. Son utilisation couplée à un microscope confocal de dernière génération (par exemple le Leica SP5), optimisé pour l'excitation infrarouge augmentera grandement ses potentialités. L'utilisation de fibres plus longues permettra d'élargir encore le spectre d'excitation utilisable. Cependant, afin de conserver une spécificité d'excitation grâce à l'utilisation de filtres, cette étape nécessite tout d'abord un couplage limitant les pertes de puissance.

D'autres solutions présentant un compromis entre accordabilité et fréquence d'excitation sont envisageables, par exemple, en allongeant la cavité du Ti :Sa. Dans ce cadre, le système *cavity dumper* peut être utilisé afin de déporter la sortie de cavité ; il donne une fréquence de 56Mhz, parfaitement adaptée aux mesures avec les protéines de la famille des GFP, tout en gardant la possibilité d'ajuster facilement la longueur d'onde d'excitation au fluorophore étudié.

## b Les détecteurs :

Trois grandes catégories de détecteurs ponctuels peuvent être utilisées lors d'expériences de TCSPC, à savoir les tubes photomultiplicateurs (PMT) les diodes à avalanche (APD) et les détecteurs à galettes de micro-canaux (MCP-PMT).

Le principe de fonctionnement de ces trois détecteurs est conceptuellement différent (figure 58)



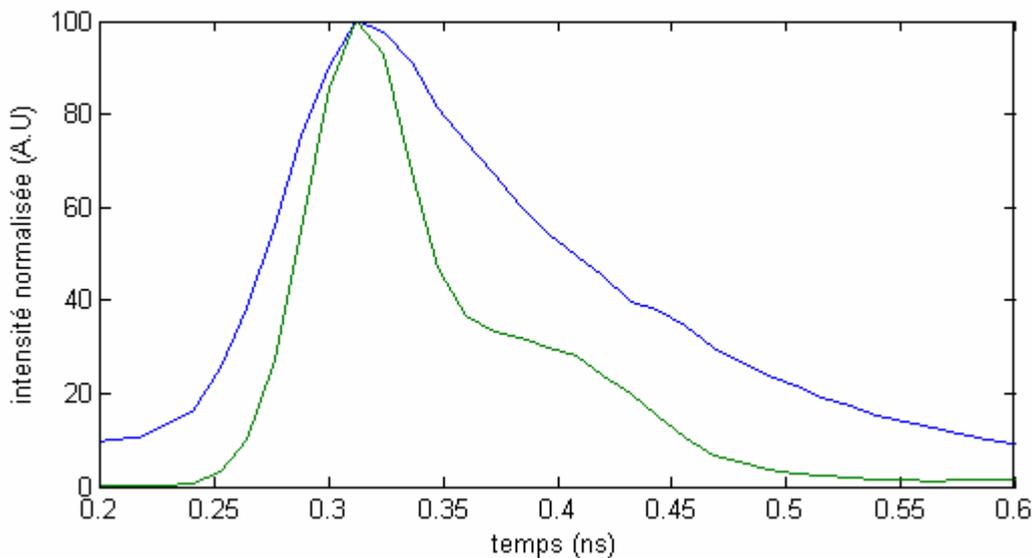
58: schéma de principe de détecteurs de type MCP-PMT (A), PMT (B) et APD (C). voir le texte pour plus de détails.

Cette variabilité implique des caractéristiques techniques très variées :

- **MCP-PMT** : le photoélectron détaché de la photocathode va être multiplié à l'intérieur d'un des canaux de la galette, entraînant une forte amplification du signal. Une deuxième galette peut alors être positionnée pour multiplier d'autant plus le nombre d'électrons avant d'atteindre l'anode. Ce mode d'amplification est très rapide. La probabilité de passer deux fois consécutivement par le même canal étant très faible, le temps de rémanence de ces derniers devient négligeable. La FWHM d'un tel détecteur est de l'ordre de 30ps. La contrepartie de ce type de détecteurs est sa fragilité, le rendant par exemple impropre à une utilisation dans un service commun de microscopie.

- **PMT** : dans ce cas, le photoélectron va être multiplié après chaque collision avec une dynode. Une forte différence de tension appliquée entre chaque dynode entraînera la collision des électrons générés avec les dynodes successives. Ce type de détecteur permet donc également une bonne amplification du signal mais à une vitesse un peu plus lente (FWHM  $\sim 200$ ps). Il présente en contrepartie une robustesse bien supérieure à celle des détecteurs de type MCP-PMT
- **APD** : ici, les photons qui pénètrent dans le semi-conducteur constitutif de la diode, peuvent créer des photoporteurs en excès dans le matériau. Ces photoporteurs sont des paires d'électrons-trous. L'accélération acquise par quelques porteurs est suffisante pour leur permettre de générer à leur tour des paires électrons-trous par choc avec les atomes du cristal que constitue le semi-conducteur. Ces paires sont à leur tour accélérées et peuvent créer d'autres paires, il en résulte un processus en chaîne, l'effet avalanche. Ce type de détecteur présente un mode de détection pratiquement exempt de bruit électronique. Le temps de réponse du système est par contre relativement élevé (FWHM  $\sim 1$ ns), le temps entre l'arrivée d'un photon et la production d'un signal électrique dépendant fortement de la profondeur de semi-conducteur traversé avant conversion.

L'objectif de notre étude étant d'obtenir la meilleure précision de mesure des temps de vie de fluorescence, notre choix s'est porté sur un détecteur de type MCP-PMT, ce dernier présentant la meilleure réponse instrumentale disponible (figure 59).



59 : réponse instrumentale comparée du MCP-R3809U-52 et du PMC100.

Une deuxième considération à prendre en compte est le nombre de photons nécessaire à une analyse robuste de nos déclin d'émission de photons. Ce nombre de photons doit cependant être obtenu en minimisant le niveau d'excitation appliqué à l'échantillon et en conservant une réponse instrumentale de bonne qualité.

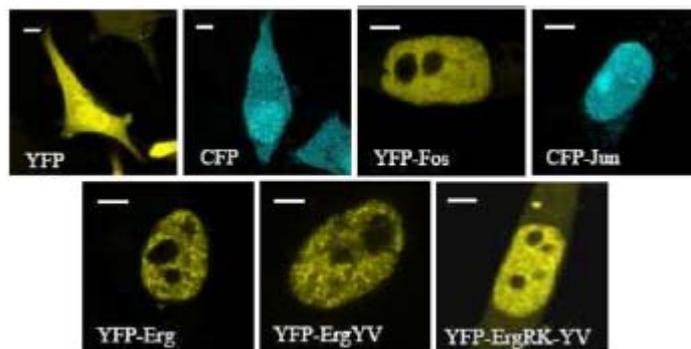
Une solution répond actuellement à ces différents critères, la MCP 3809U-64 (Hamamasu). En effet, cette dernière présente une FWHM de 75.3ps (contre 36ps pour la MCP dont nous disposons) pour un rendement quantique de 38%, valeur 2 fois supérieure à celle de la MCP3809U-52 qui est de l'ordre de 18%. Cette solution semble être un compromis idéal entre précision et rendement. Elle a donc été implémentée et elle est en cours de caractérisation au laboratoire.

### c Première application : étude des interactions Jun/Erg en cellule vivante.

Ce travail a donné lieu à une publication disponible en annexe de ce manuscrit

#### i) FRET par photoblanchiment de l'accepteur

Le premier travail que nous avons réalisé, en collaboration avec l'équipe de M. Duterque-Coquillaud, a été l'étude des interactions entre Jun et Erg en cellules vivantes. Pour cette expérience, nous disposions d'un témoin positif d'interaction, le couple Jun-CFP/Fos-YFP, dont l'interaction a été confirmée par différentes techniques *in vitro* et *in vivo* (79). Comme nous le voyons sur la figure 60, Fos et Erg présente une distribution spatiale comparable, et donc, vraisemblablement le même environnement local et les mêmes modifications potentielles de temps de vie dues à l'environnement.



60 : images de fluorescence réalisées par microscopie confocale sur des cellules HeLa transfectées transitoirement par des protéines de fusions CFP ou YFP. L'émission de la CFP est représentée en bleue (Ex. 45nm, Em. 465-495nm) et celle de la YFP en jaune (Ex. 514nm, Em. 525-565nm). Barre d'échelle 5 $\mu$ m

L'interaction de Jun et Erg ayant déjà été étudiée *in vitro* (80), les zones potentielles pour l'interaction à la fois avec Jun et avec l'ADN étaient connues. Deux mutants de Erg fusionnés à la YFP ont donc été utilisés. Le premier, ErgYV présente une délétion de la zone présumée responsable de l'interaction avec Jun. Le deuxième, ErgRK-YV présente, en plus de cette délétion, une mutation du site présumé d'interaction entre ERG et sa cible ADN : le motif enhancer du virus du Polyome Py.

Lors d'une étape préliminaire d'étude, nous avons utilisé la technique de FRET par photoblanchiment de l'accepteur pour étudier l'interaction Jun/Erg. Dans un premier temps, nous avons calculé l'efficacité de FRET de façon classique comme dans la majorité des systèmes commerciaux avec la formule suivante (81) :

$$E = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}} \quad \text{Eq.11}$$

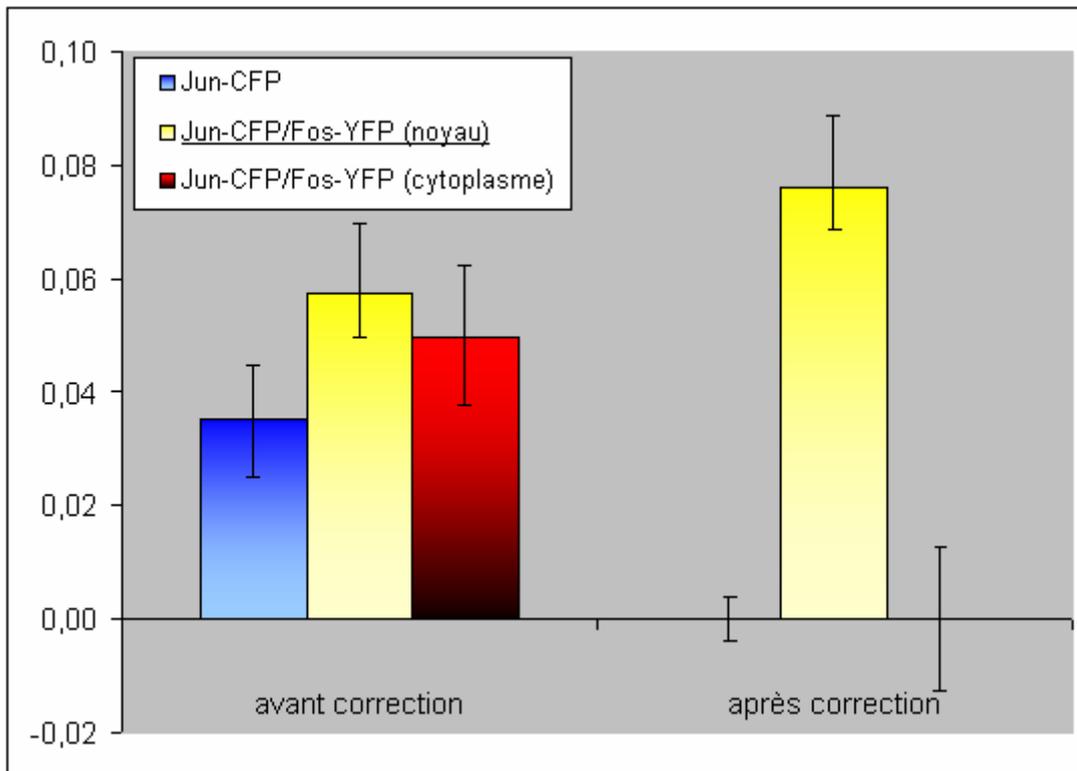
Avec  $E$  l'efficacité de FRET,  $D_{post}$  l'intensité du donneur après photoblanchiment de l'accepteur et  $D_{pre}$  l'intensité initiale du donneur.

Cette méthode utilise des ratios d'images pixel par pixel, conduisant à d'importantes aberrations pour les zones où le rapport signal sur bruit est faible. De plus, le processus d'acquisition peut entraîner un photoblanchiment non spécifique de la CFP, réduisant la qualité des mesures de FRET. Enfin, des instabilités du système d'acquisition peuvent entraîner de nombreux artefacts. Nous avons donc adapté l'équation 11 afin qu'elle prenne en compte le photoblanchiment et le bruit de fond de l'image. Pour cela, la moitié de la cellule est photoblanchie, de façon à servir de témoin interne pour les acquisitions. La variation du niveau d'expression de la CFP sera alors comparée entre la zone photoblanchie et la zone témoin grâce à la formule suivante.

$$E = \frac{(1 + ab).(D_{post} - bck_{post}) - (D_{pre} - bck_{pre})}{(D_{post} - bck_{post})} \quad \text{Eq.12}$$

Avec  $E$  l'efficacité de FRET,  $D_{post}$  l'intensité du donneur après photoblanchiment de l'accepteur et  $D_{pre}$  l'intensité initiale du donneur.  $bck_{post}$  et  $bck_{pre}$  le bruit de fond avant et après photoblanchiment et  $ab$  le niveau moyen de photoblanchiment du donneur.

Cette formule permet d'améliorer la qualité de nos mesures comme l'illustre la figure suivante :



61: efficacité de FRET mesuré sur notre témoin positif (Jun-CFP/Fos-YFP) et deux témoins négatifs.

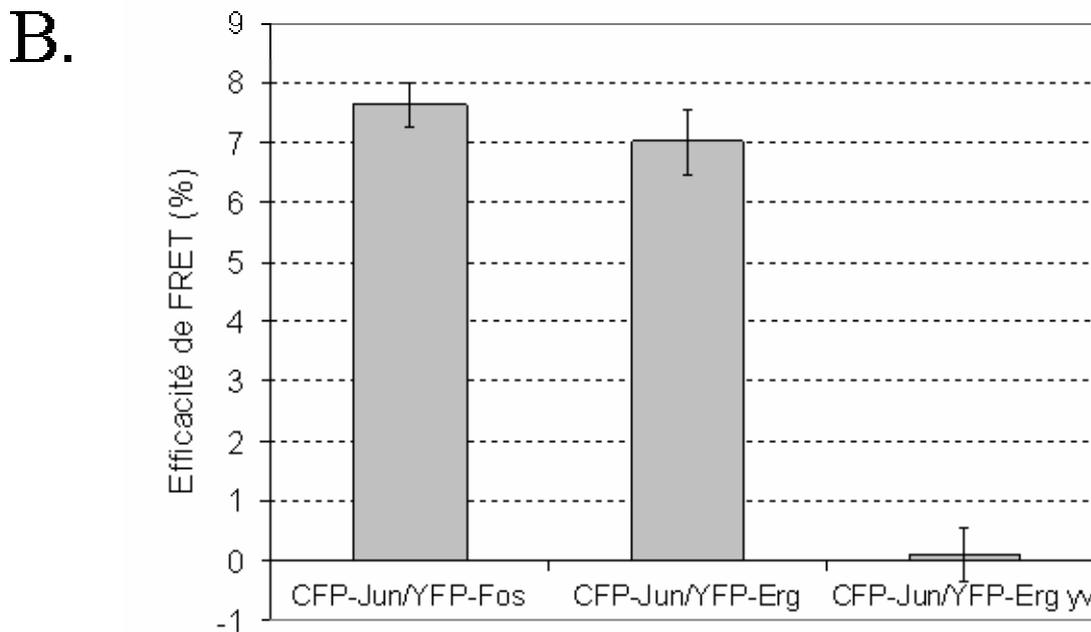
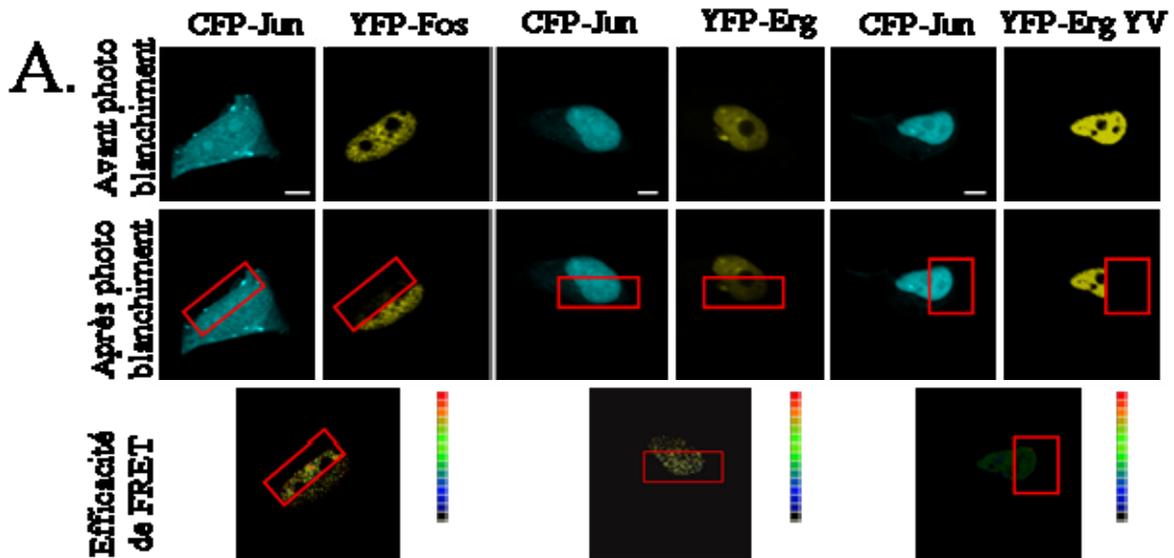
Sachant que Fos est absent du cytoplasme et présente une forte affinité pour Jun, on peut en déduire que pour des mesures impliquant Jun-CFP et Fos-YFP :

- l'efficacité de FRET est nulle en l'absence de Fos, c'est-à-dire dans les cellules n'exprimant que Jun ou dans le cytoplasme des cellules co-transfectées.
- L'efficacité de FRET est forte dans la zone de co-localisation de Jun et Fos : le noyau.

Les mesures d'efficacité de FRET avant correction ne nous permettent que difficilement de distinguer ces trois configurations.

L'utilisation de la formule 12 permet par contre facilement de les différencier. Cette formule a donc été appliquée à l'étude des interactions de Jun et Erg et nous fournit les résultats présentés figure 62 A et B. Les mesures d'efficacité de FRET confirment bien l'interaction entre Jun et Erg, ces dernières présentant des valeurs similaires à celles mesurées entre Jun et Fos. L'absence d'interaction entre Jun et Erg YV confirme notre hypothèse avec un retour à 0 de l'efficacité de FRET mesurée. Cette technique présente cependant une

sensibilité assez faible ; c'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer des mesures de FLIM pour les études plus approfondies.



62: résultats de pb-FRET mesuré sur CFP-Jun et différents partenaires.

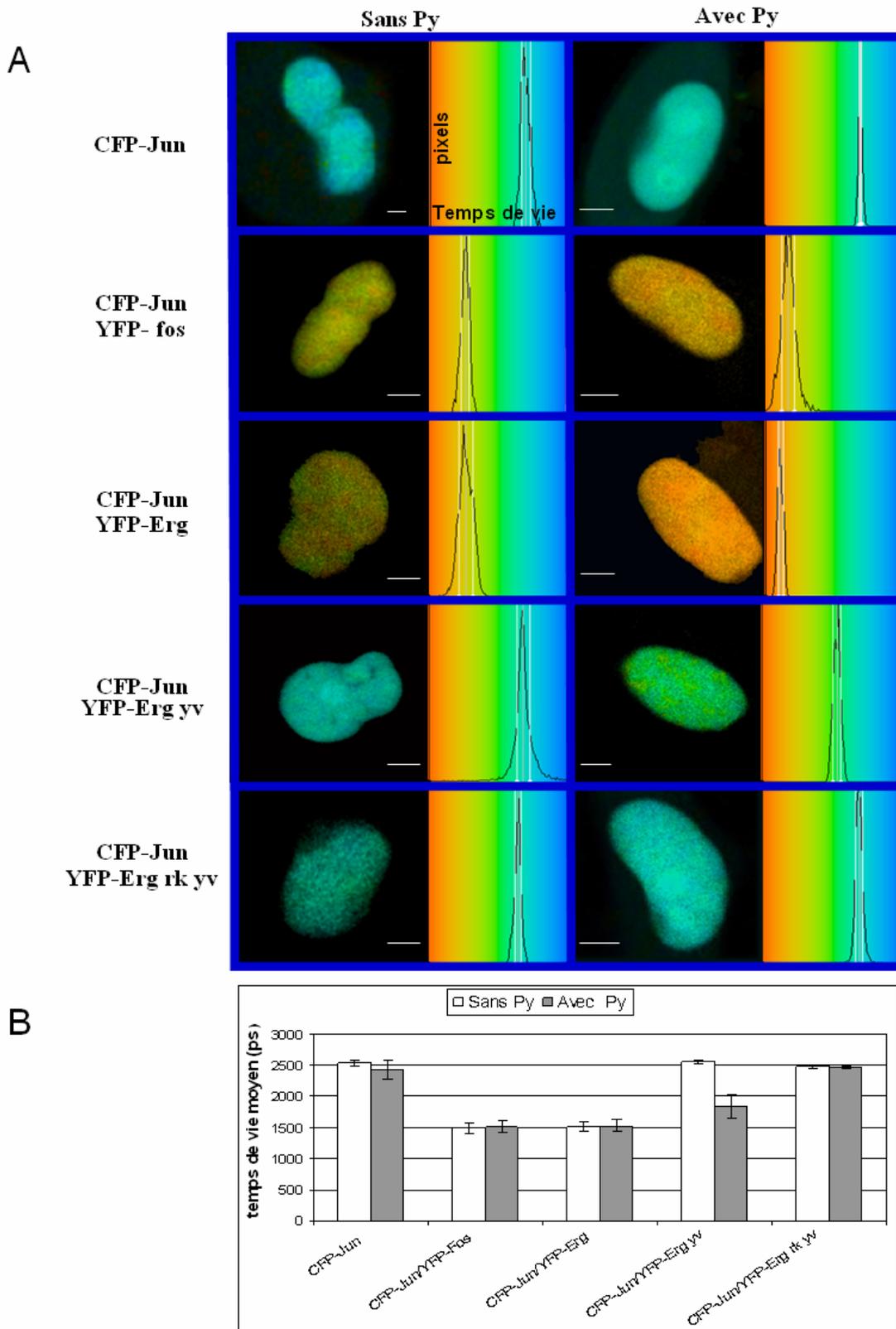
A : images des canaux CFP et YFP de Jun et ses différents partenaires. En rouge est figurée la zone de bleach. L'image d'efficacité de FRET est calculée en utilisant l'équation 12

B : représentation statistique des résultats de pb-FRET présentés en A (acquisitions réalisées sur 15 cellules par condition)

***ii) FRET par mesure de FLIM***

Après avoir démontré l'interaction entre Jun et Erg en cellule fixée, et afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces modes de régulation, il est nécessaire de pouvoir suivre ces interactions en cellule vivante. Nous avons également voulu tester l'influence de la cible ADN sur la constitution du complexe Jun/Erg. Nous avons pour cela réalisé des mesures de temps de vie sur des cellules Hela exprimant la protéine Jun-CFP en présence d'Erg-YFP et de ses différents mutants précédemment nommés. Pour chacun de ces couples, nous avons testé l'influence de l'introduction de cibles *Py* surnuméraires sur le niveau d'interaction mesuré. L'ensemble des résultats est présenté figure 63.

Lors de ces expériences, nous avons tout d'abord réalisé des mesures de temps de vie sur la protéine fusionnée Jun-CFP qui constitue notre témoin négatif d'interaction ( $2500 \pm 50$  ps.) Nous avons ensuite étudié notre témoin positif d'interactions : le couple Jun-CFP/Fos-YFP. Le temps de vie mesuré pour la CFP est alors de  $1500 \pm 100$ ps. Les temps de vie des autres couples de protéines ont ensuite été comparés à ces deux valeurs de temps de vie. Le couple Jun-CFP/Erg-YFP, présente un temps de vie de fluorescence similaire à celui du couple Jun/Fos, confirmant l'interaction entre ces deux protéines en cellule vivante. Cette interaction est entièrement abolie après l'introduction de la mutation *yv* au niveau d'Erg, le couple ayant alors un temps de vie identique à celui de cellules exprimant Jun-CFP seul. Il est intéressant de constater que l'introduction de la cible ADN, *Py*, dans les cellules comportant cette protéine mutante, conduit à une réponse de temps de vie intermédiaire entre nos témoins positifs et négatifs. Nous avons alors émis l'hypothèse d'une interaction indirecte entre Jun et Erg, les deux partenaires étant maintenus en forte proximité par la présence d'une cible ADN commune. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un double mutant dont les zones de fixation présumées à l'ADN et à Jun ont été supprimées (le mutant Erg *rk yv*). Les mesures de temps de vie réalisées sur Jun-CFP en présence de ce mutant nous donnent à nouveau une réponse identique à notre témoin négatif, confirmant notre hypothèse quant au rôle stabilisateur de l'ADN dans la formation de ce complexe de facteurs de transcription.



63: étude de FLIM réalisée sur différentes cellules Hela co-exprimant différentes protéines, et ce, avec ou sans la séquence d'ADN Py.

A : images de distributions des temps de vie de CFP-Jun dans les différentes conditions étudiées (les temps de vie bas sont représentés en orange, les plus élevés en bleu). La barre d'échelle correspond à 5µm.

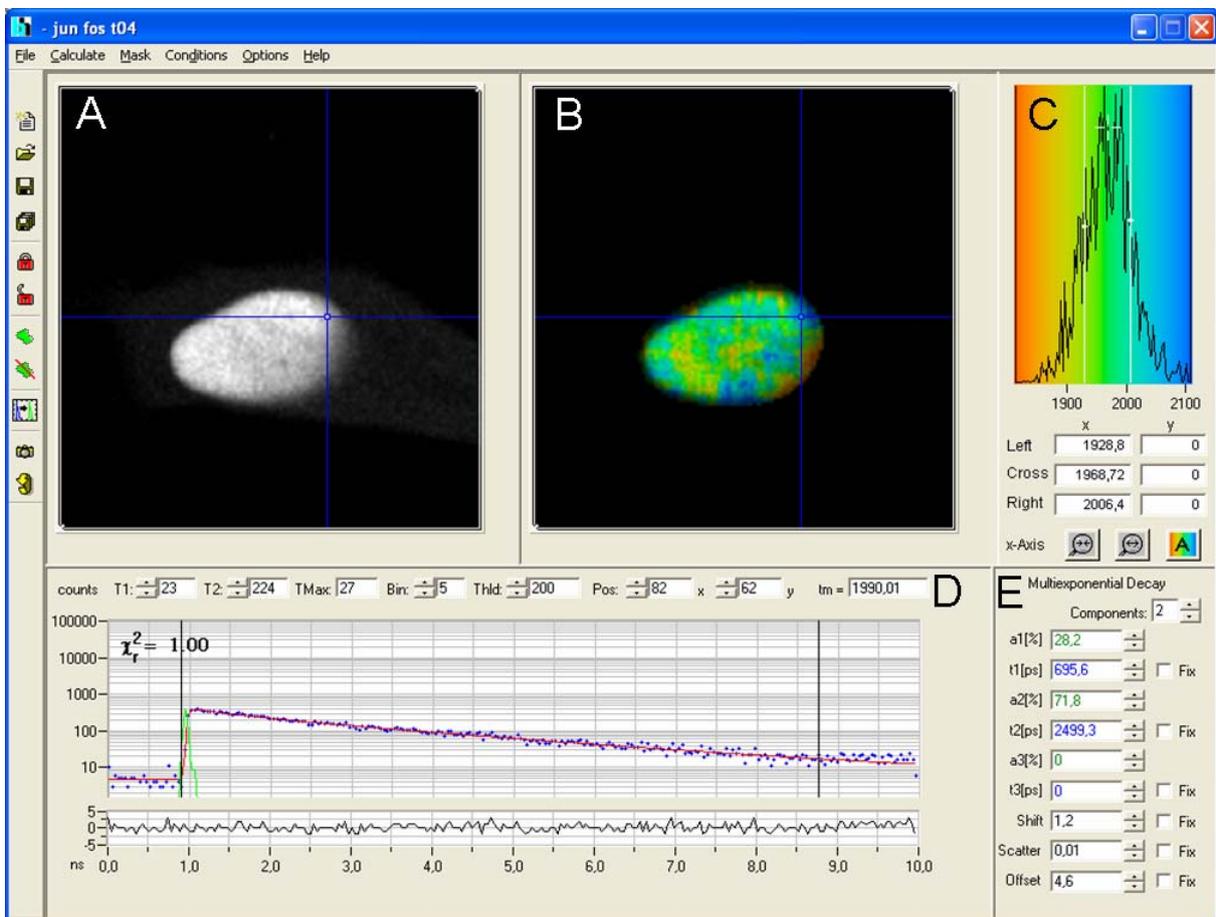
B : temps de vie moyen et écart type de ces différentes conditions (mesures réalisées sur 15 cellules par conditions).

## Section.3 Méthodes d'analyse des courbes de déclin de fluorescence.

### a Optimisation de l'ajustement des courbes de déclin de fluorescence

#### i) Présentation du logiciel SPCImage (B&H)

L'analyse des courbes de déclin de fluorescence est une étape cruciale de la détermination des valeurs de temps de vie. Pour réaliser cette étape, nous disposons initialement du logiciel SPCImage. Ce dernier se présente de la façon suivante :



64: capture d'écran du logiciel SPCImage (voir le texte pour plus de détails)

L'interface du logiciel est décomposée en 5 grandes parties :

- A : L'image d'intensité de fluorescence
- B : L'image de temps de vie de fluorescence. Le code couleurs utilisé est le même qu'en C et le modèle d'ajustement utilisé peut être choisi en E

- C : distribution des temps de vie de fluorescence au sein de l'image représentée en nombre de pixels en fonction du temps de vie de fluorescence (ps)

Ces trois parties sont facultatives ; elles ne sont utilisées qu'en mode image de temps de vie et permettent la visualisation de ces informations. La partie inférieure du logiciel permet quant à elle de déterminer les paramètres d'ajustement et de tester la qualité de ces derniers :

- D : cette fenêtre est utilisée pour l'affichage de la courbe de déclin de fluorescence, ainsi que celle de la courbe d'ajustement et de la réponse instrumentale. Elle fournit également deux éléments clefs de la détermination de la qualité de l'ajustement : *i* la valeur de  $\chi^2$  réduit. Plus cette valeur est proche de 1 et plus l'ajustement sera correct. *ii*, les résidus d'ajustement qui rendent compte de la différence entre la courbe et son ajustement.

Dans le cas d'une image, la courbe représentée correspond, au pixel près, à l'intersection des deux lignes bleues (A et B). C'est à ce niveau que le réglage de la moyenne spatiale (bin) et le seuil d'analyse (thld), en nombre de photons crête minimale, pourront être fixés.

- E : cette fenêtre permet de fixer les paramètres du modèle utilisé pour réaliser l'ajustement. En particulier, le choix du nombre d'exponentielles du modèle d'ajustement pourra être fixé entre 1 et 3. Il sera également possible de fixer certaines valeurs de temps de vie dans le cas de connaissances *a priori* sur le modèle (mélange de fluorophores de temps de vie connus, temps de vie du donneur seul pour les expériences de FRET...)

## ***ii) Limitations rencontrées***

L'utilisation du logiciel SPCImage permet d'obtenir rapidement l'ajustement de courbes ou d'images de déclins de fluorescence (temps réel pour l'ajustement des courbes, quelques secondes pour une image de 128\*128\*256).

Cette vitesse d'exécution a cependant nécessité certains compromis quant au mode d'ajustement des courbes :

- Le nombre d'itérations maximum de l'algorithme est limité à 10. L'ajustement sera donc le plus souvent stoppé par cette contrainte, et non par l'obtention d'un  $\chi^2$  optimum.
- Elle utilise un algorithme de minimisation de type Levenberg-Marquardt (82,83). Cette solution permet d'obtenir rapidement l'ajustement de courbes présentant peu de photons. Elle est cependant très sensible à un mauvais choix de valeurs initiales et pourra devenir instable dans des expériences présentant un nombre de photons important ou nécessitant un modèle comportant plus de deux exponentielles (83).
- L'obtention d'images de temps de vie utilise une convolution par une réponse instrumentale calculée sur le front de montée de la courbe. Le remplacement d'une IRF mesurée par une IRF théorique de forme simple (le plus souvent de type gaussienne) accélère énormément la vitesse d'ajustement mais peut entraîner de fortes imprécisions.
- Le nombre de composantes exponentielles est borné à 3. Cette valeur n'est pas limitante dans la majorité des expériences réalisées en cellule, la limite du nombre d'exponentielles du modèle étant liée au nombre de photons acquis. Elle peut cependant le devenir pour les études réalisées en solution ou après accumulation de mesures de temps de vie successives.

Au-delà de ces contraintes liées à la vitesse d'exécution de l'ajustement, d'autres limitations ont été rencontrées lors de l'utilisation de SPCImage :

- Au cours de l'ajustement, il est possible de fixer les valeurs de temps de vie calculées pour certaines espèces. Cette solution n'est pas optimale lorsqu'elle est appliquée aux études réalisées dans la cellule. En effet, les temps de vie seront le plus souvent distribués autour d'une valeur centrale de par les variations locales d'environnement, y compris pour un fluorophore présentant un déclin de type mono-exponentiel en solution. La possibilité de fixer des bornes à chacune des espèces semble donc ici plus appropriée.
- Le logiciel entraîne parfois des incohérences de couleurs d'affichage entre les valeurs affichées en B et C. (figure 64).
- L'accumulation de photons mesurée en différents points de l'espace pour améliorer les statistiques des courbes de déclin est obtenue sur des régions de taille carrée. Ce type de forme est peu adapté aux structures rencontrées en biologie. De plus, le mode de sélection de ces régions d'accumulation n'est pas clairement identifiable sur les images finales obtenues.
- De façon plus générale, ce logiciel ne permet pas le développement et l'intégration de solutions analytiques innovantes et dédiées à des problématiques spécifiques, parce qu'on ne peut pas lui intégrer de *modules* ou de *plug-in* externes.

***iii) Développement d'une plateforme ouverte d'analyse des courbes de déclins : le logiciel Titan.***

Suite à ces différentes limitations rencontrées lors de l'analyse des données sous SPCImage, nous avons entrepris, avec Dave Trinel (IRI, Lille), de développer le logiciel Titan. L'objectif de notre système est d'obtenir un ajustement dont le fonctionnement est entièrement connu et configurable. Cette base nous permet alors d'intégrer différentes optimisations des modes d'ajustement de nos courbes. Le logiciel Titan lit directement les fichiers sdt, format propriétaire d'acquisition Becker&Hickl, pour conserver une utilisation conviviale de ce système sur les données acquises par le truchement d'une carte SPC.

### **(1) Modes d'ajustement des données sous Titan**

Une grande partie du logiciel, développé sous Matlab, est dédiée à l'ajustement des courbes de déclin. Il utilise un ajustement par les moindres carrés dont le principe est de minimiser la somme des carrés des erreurs entre l'équation d'ajustement et les données sources. La fonction utilisée à cet effet est *lsqnonlin* de *Matlab*. Le fonctionnement de cet algorithme est le suivant :

Pour chaque point  $i$  de la courbe, on calcule

$$f_i(x) = V_i - (b + IRF \otimes \sum_j a_j \cdot e^{(-t/\tau_j)}) \quad \text{Eq. 12}$$

Avec  $i$  le canal temporel,  $V$  le nombre de photons en  $i$ ,  $b$  niveau de base,  $IRF$  la réponse instrumentale de notre système,  $j$  l'espèce fluorescente présente,  $a$  sa proportion et  $\tau$  son temps de vie.

Pour simplifier l'écriture, nous avons posé  $x$ , un vecteur dans lequel sont enregistrées les variables  $a_j$  et  $\tau_j$ .

L'algorithme va alors faire évoluer  $x$  pour calculer :

$$\chi_{\min}^2 = \min_x \frac{(\frac{1}{2} \sum_i f_i(x)^2)}{(\sqrt{\text{variance}})^2} \quad \text{Eq. 13}$$

Les valeurs de  $x$  ainsi obtenues seront les meilleurs paramètres permettant de décrire notre acquisition par le modèle choisi et la valeur de  $\chi^2$  obtenue rend compte de la qualité de l'ajustement.

Différents algorithmes existent pour réaliser cette minimisation du  $\chi^2$ , chacun d'entre eux étant optimisé pour des conditions particulières d'applications.

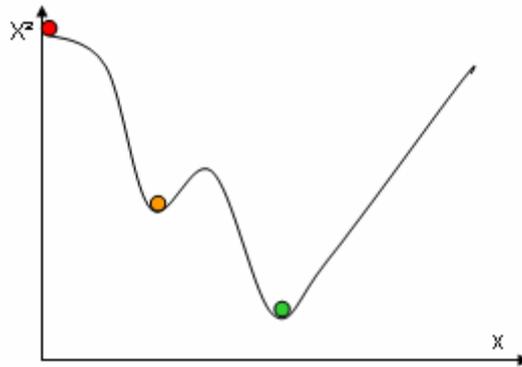
Titan permet de choisir parmi ces modèles le plus approprié aux données étudiées. Nous avons actuellement intégré deux de ces algorithmes de minimisation :

- L'algorithme de Levenberg-Marquardt, le plus utilisé pour ce type d'ajustement
- Un algorithme de type *Trust Region*. Ce dernier, bien que nécessitant un temps d'ajustement plus long convergera vers la solution optimale, y compris si les paramètres initiaux en sont très éloignés.

Notre objectif étant de laisser à l'utilisateur la plus grande souplesse dans ses choix de modèle d'ajustement, chacune des variables peut être fixée ou bornée indépendamment des autres. L'utilisateur aura également le choix entre un ajustement utilisant une IRF théorique ou une IRF mesurée.

## **(2) Ajustements et minimums locaux d'énergie :**

Un des points clés de la minimisation du  $\chi^2$  consiste à gérer les minimums locaux d'énergie que celui-ci peut rencontrer :

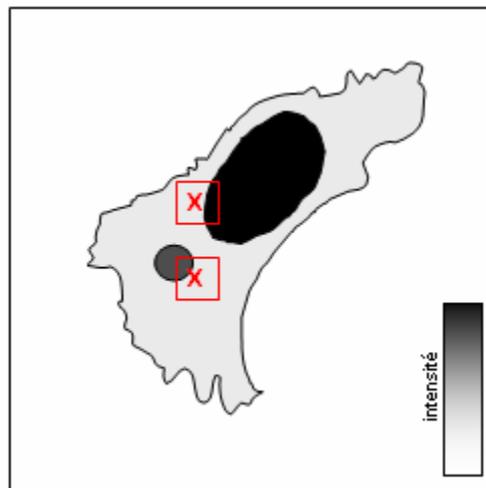


65: représentation schématique du  $\chi^2$  en fonction de notre vecteur de variable  $x$ . la valeur initiale de  $x$  est représentée en rouge, en orange se trouve un minimum local du  $\chi^2$  et en vert, la solution optimale.

En effet, au cours de l'ajustement des données, le  $\chi^2$  peut présenter des états localement stables. L'algorithme testant la diminution du  $\chi^2$  après évolution des paramètres du modèle, il peut facilement considérer ces minimums locaux comme des solutions correctes de l'ajustement. Les algorithmes de minimisation que nous utilisons permettent de réinjecter de l'énergie lorsque le  $\chi^2$  semble stabilisé. Si cette énergie est suffisante, elle permettra de franchir ce minimum et de converger vers la solution. Lors de nos ajustements, nous avons observé des cas où ces minimums ne peuvent être franchis. Nous avons donc intégré la possibilité de réguler cette fonction d'ajustement en modifiant de façon séquentielle les zones de fluctuations de nos différentes variables. La solution présentant le  $\chi^2$  le plus proche de 1 sera alors considérée comme la plus pertinente.

### ***(3) Segmentation rationnelle***

L'analyse des courbes de déclin de fluorescence nécessite un nombre important de photons pour être robuste (45). Le travail en cellule vivante implique cependant une excitation minimale de l'échantillon, de façon à minimiser le stress cellulaire. Le compromis entre ces deux contraintes est assez complexe à mettre en œuvre lors d'acquisition d'images de temps de vie. La solution la plus couramment utilisée consiste à réaliser des acquisitions de 5 à 10 mn, ces dernières nécessitant ensuite l'utilisation de l'option *bin* pour une valeur de 3 à 5. Pour chaque pixel, le logiciel définit une région carrée de  $(2n+1)^2$  soit respectivement 49 et 121 pixels centrée sur les pixels observés et accumule tous les photons mesurés dans cette zone. Cette technique est particulièrement efficace pour une analyse sans a priori de l'échantillon observé. Par contre elle ne permet pas de tenir compte de la morphologie de la cellule. Les deux exemples présentés figure 66 donneront des zones de *bin* dont la majorité des photons proviendront de structures non cytoplasmiques malgré la localisation initiale des pixels.



*66 : principe du bin sous SPCImage. Les croix donnent deux exemples de positions de pixels et de la zone de bin associée (la représentation est à l'échelle)*

Pour éviter ces importants effets de bords, il semble plus rationnel de définir des zones ayant une signification biologique.

A cette fin nous avons intégré la possibilité de réaliser une segmentation basée sur l'image d'intensité obtenue conjointement aux acquisitions d'imagerie de déclin. Le logiciel Titan permet à l'heure actuelle différents modes de sélection des zones dont les photons devront être regroupés en une courbe de déclin :

- Une segmentation manuelle.
- Une sélection basée sur des seuils d'intensité de fluorescence.
- Une sélection basée sur un masque de segmentation importé à partir du logiciel ImageJ, ce dernier comportant la majorité des modes de sélections actuellement implémentés.

#### **(4) Conclusion**

Le logiciel que nous avons développé permet d'améliorer l'analyse des mesures de temps de vie. Ce logiciel reste en cours de développement et constitue une boîte à outils constituée des fonctions fondamentales d'ajustement des courbes de déclin. Il est actuellement en phase de test et sera mis à disposition de la communauté scientifique dès que sa notice d'utilisation sera finalisée.

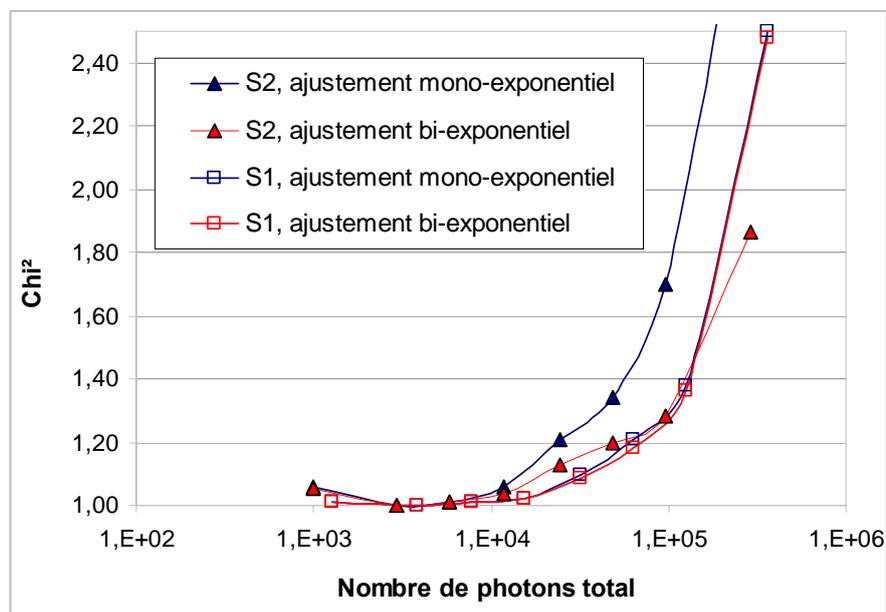
Parmi les perspectives de développement actuelles, nous comptons intégrer un module d'analyse globale des courbes. Ce type d'ajustement permet de minimiser en parallèle le  $\chi^2$  sur différentes courbes avec l'a priori que certaines des variables ont les mêmes valeurs pour ces différentes courbes. Ce type d'analyse est particulièrement intéressant pour les études de FRET : *i* dans le cas général, la valeur de temps de vie du donneur seule pourra être minimisée de façon égale entre les différentes expériences, *ii* dans le cas où la distance entre les deux fluorophores est supposé constante (sondes de type *Cameleon*, règles moléculaires...), les deux temps de vie du donneur pourront être liés lors de l'ajustement.

Un autre élément, spécifique de l'analyse d'image de temps de vie, est le choix du modèle d'ajustement en chaque point. Comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, nous avons développé un module sous ImageJ permettant de réaliser ce choix de façon automatique et rationnelle sur les données ajustées sous SPCImage. Nous pensons, dans un deuxième temps intégrer ce type de procédure sous Titan.

## b Choix du modèle d'ajustement et images hétérogènes.

### i) Problème d'ajustement pour les images de temps de vie.

Dans le cas de l'imagerie de temps de vie, 2 critères sont principalement utilisés pour choisir le modèle exponentiel à appliquer, le  $\chi^2$  et les résidus d'ajustement. Le modèle choisi est alors appliqué à la totalité de l'image. Cependant, dans la majorité des cas, les différents pixels d'une image sont hétérogènes, et c'est ce qui fait tout l'intérêt de l'imagerie de temps de vie par rapport à une courbe de déclin globale pour une cellule. En utilisant un modèle unique, nous risquons une perte importante de contraste de FLIM et également une interprétation erronée des résultats. Nous avons donc cherché un critère permettant de choisir entre un modèle mono-exponentiel et un modèle bi-exponentiel de façon automatique pour chaque pixel de notre image. Pour ce faire, nous avons utilisé des solutions aqueuses de rhodamine B (S1) seule ou mélangées avec de la rhodamine 6G (S2). Le modèle d'ajustement pour chacune de ces solutions est alors respectivement mono-exponentiel et bi-exponentiel. Ce modèle simplifié va permettre de tester la validité de notre critère de sélection du modèle avant de l'appliquer sur des cas réels en cellules vivantes.



67:  $\chi^2$  réduit en fonction du nombre de photons pour les solutions S1 (rhodamine B) et S2 (rhodamine B et rhodamine 6G) après ajustement mono et bi-exponentiel des courbes de déclin de fluorescence.

Nous avons réalisé des acquisitions à différents temps d'exposition, permettant d'obtenir des mesures dans des conditions exactement identiques mais avec des nombres de photons comptés variables. Nous avons alors analysé nos expériences sur les solutions S1 et S2 avec

des modèles mono et bi-exponentiels. La valeur des  $\chi^2$  réduits, qui est classiquement utilisée pour le choix du modèle d'ajustement, est présentée figure 67.

La valeur du  $\chi^2$  varie à la fois en fonction de la pertinence du modèle et en fonction du nombre de photons. Le nombre de photons en chaque point d'une image en microscopie étant généralement hétérogènes, ce critère de sélection ne pourra être utilisé. Il est donc impossible de fixer une valeur seuil de  $\chi^2$  pour nous aider à choisir.

### *ii) Utilisation de la variation du $\chi^2$*

Un point intéressant se dégage cependant de ces courbes. La variation du  $\chi^2$  semble être un critère beaucoup plus pertinent. En effet, les deux courbes de S1 sont très voisines alors que les courbes de S2 divergent très rapidement. La figure 68 présente cette variation du  $\chi^2$  pour les deux solutions en fonction du nombre de photons. Cette variation est calculée grâce à la formule suivante :

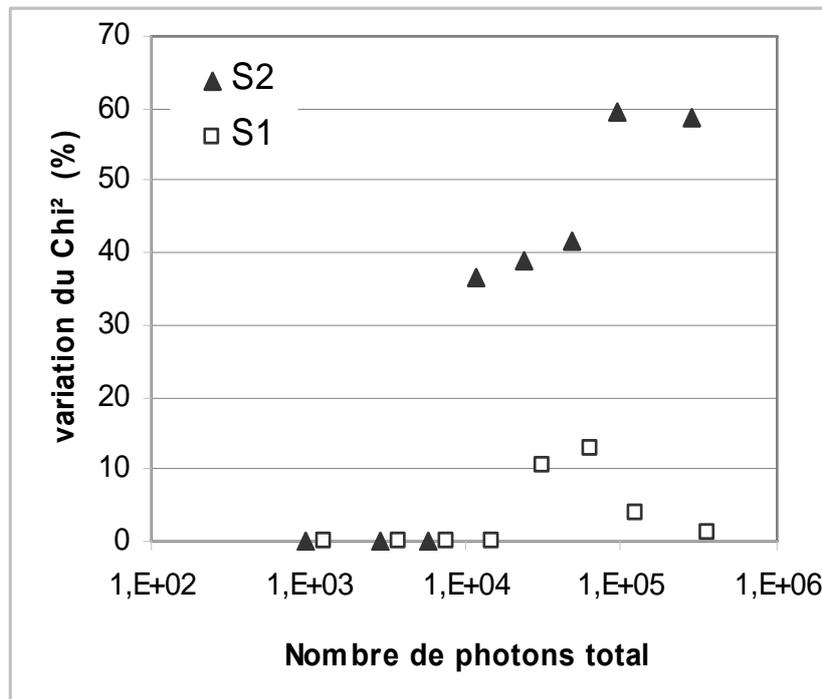
$$\Delta = \frac{((\chi_m^2 - 1) - (\chi_b^2 - 1)) \cdot 100}{(\chi_m^2 - 1)} \quad \text{Eq.13}$$

*Avec " $\chi_m^2$ " et " $\chi_b^2$ " respectivement les valeurs de  $\chi^2$  après ajustement mono et bi-exponentiel appliqués aux courbes de déclin de fluorescence.*

On peut distinguer quatre régions principales dans la courbes de variation de  $\Delta$ :

- En dessous de  $10^3$  photons, un ajustement rigoureux est très difficile à obtenir.
- Entre  $10^3$  et  $10^4$  photons,  $\Delta$  est nul. En effet, avec un nombre de photons aussi faible, l'ajustement donnera une valeur de  $\chi^2=1$ , même en cas d'erreur d'estimation. Dans ce cas, l'analyse doit être réalisée en utilisant un modèle mono-exponentiel, conformément aux remarques faites par Joseph R. Lakowicz (84).
- Entre  $10^4$  et  $10^5$  photons,  $\Delta$  devient un critère de sélection efficace. Ce seuil peut empiriquement être fixé pour un  $\Delta$  compris entre 20 et 30%.
- Au delà de  $10^5$  photons,  $\Delta$  devient un critère de sélection particulièrement efficace. En effet,  $\Delta$  est pratiquement nul si le nombre d'exponentielles est correct et il

devient supérieur à 50% quand il en manque une. Le  $\Delta$  peut donc être fixé à 30% avec un indice de confiance très élevé.

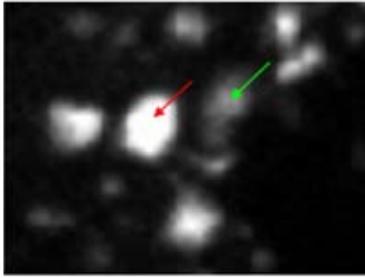


68:  $\Delta$  (variation du  $\chi^2$ ) en fonction du nombre de photons pour les solutions S1 et S2.

### iii) Application du système de choix de modèle en cellules vivantes.

Nous avons ensuite voulu tester ce mode de sélection du modèle par le  $\Delta$  sur des échantillons biologiques. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié des cellules HeLa exprimant deux petites GTPases de la famille des Rab, l'une fusionnée à la CFP et l'autre à la YFP. Ces protéines sont localisées dans l'appareil de Golgi qui a été dispersé après traitement au nocodazole.

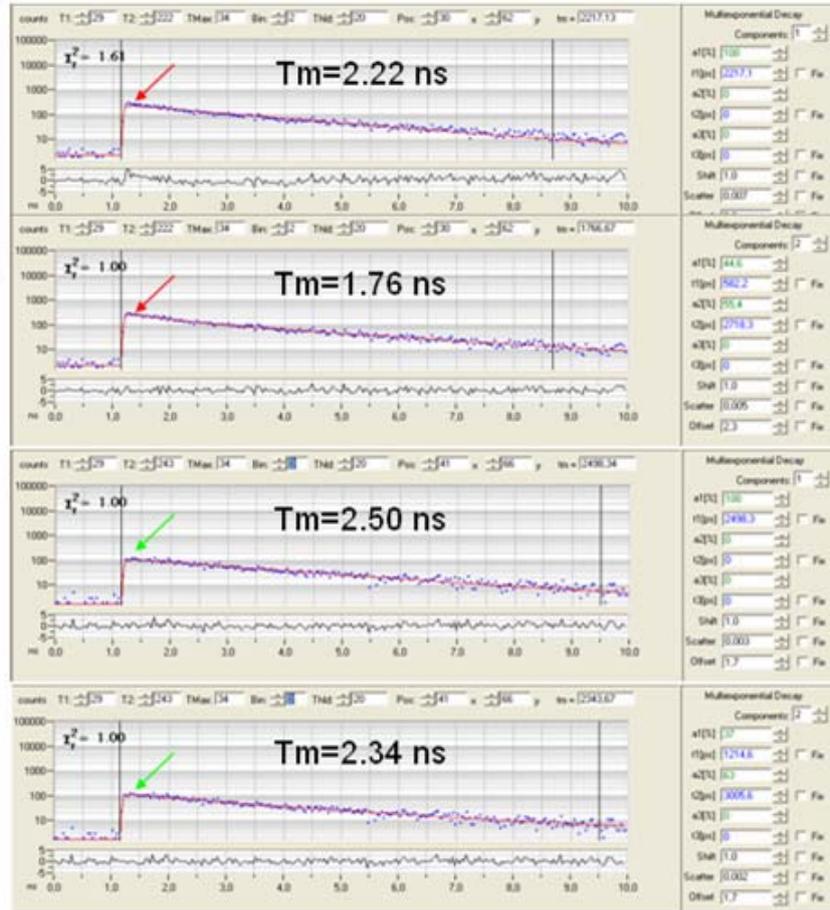
La figure 69 présente une de ces images et les ajustements d'ordre 1 et 2 de deux pixels ainsi que les résidus et  $\chi^2$  associés.



Erreur de temps de vie moyen suite à un choix de modèle erroné:

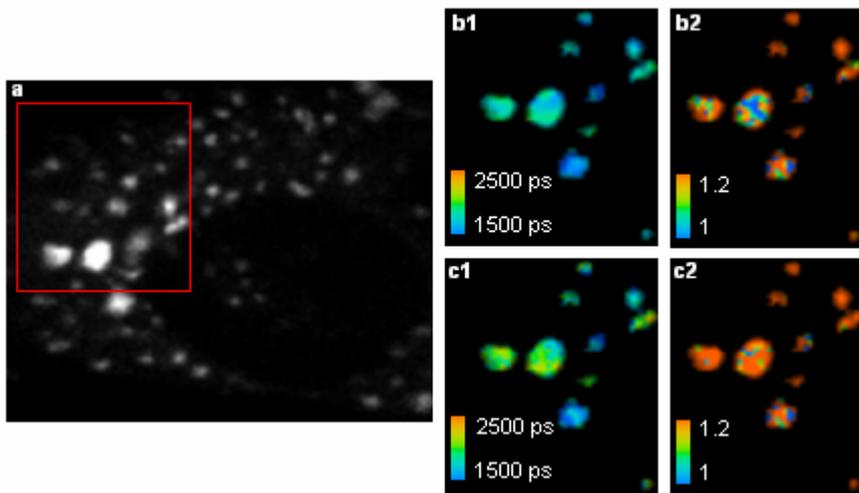
451 ps

155 ps



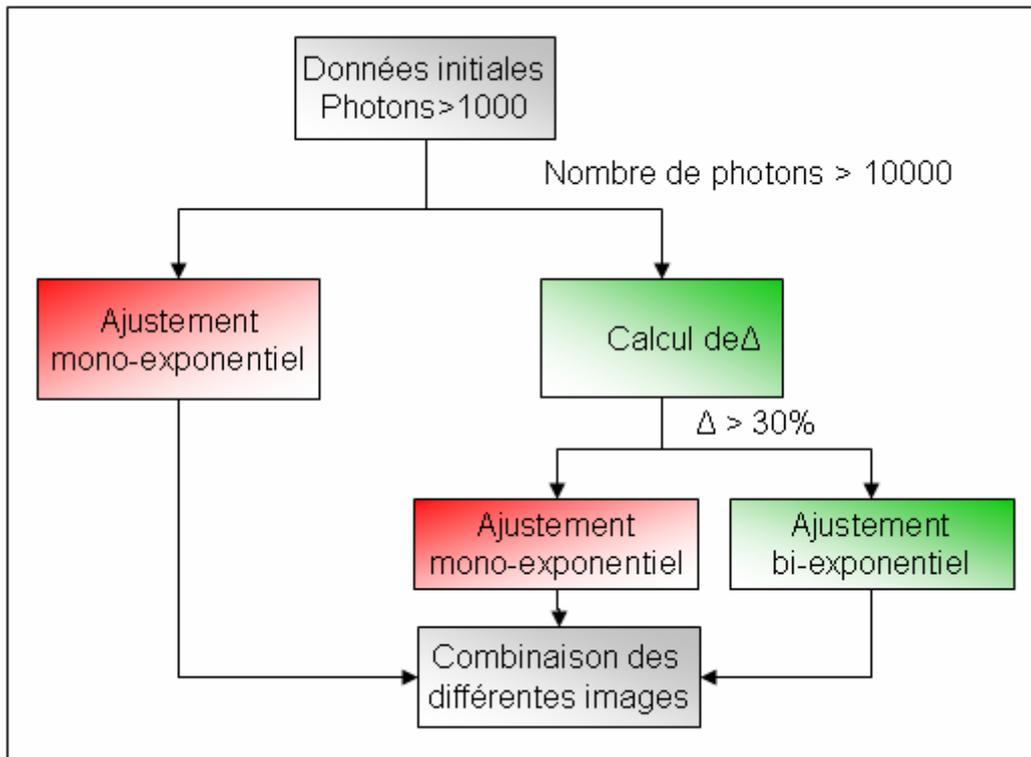
69 Appareil de golgi dispersé d'une cellule Hela exprimant deux protéines Rab ainsi que les declins de deux pixels marqués par les flèches. Dans les deux cas, la courbe supérieure correspond à une analyse mono-exponentielle, la deuxième étant ajustée par un modèle bi-exponentiel.

Comme nous le voyons ici, ces deux zones nécessitent des modèles d'ajustement différents. L'erreur sur le choix du modèle se répercute sur le temps de vie mesuré avec une erreur pouvant atteindre 450ps. L'analyse point par point des images de temps de vie peut donc être indispensable pour étudier le FRET. La figure 70 présente l'ensemble des données extraites d'une analyse sous SPCImage. Ces données illustrent bien les inhomogénéités d'ajustement mais elles n'offrent pas d'image de temps de vie prenant en compte cette hétérogénéité. Une étape supplémentaire de l'analyse de ces images doit donc être réalisée.



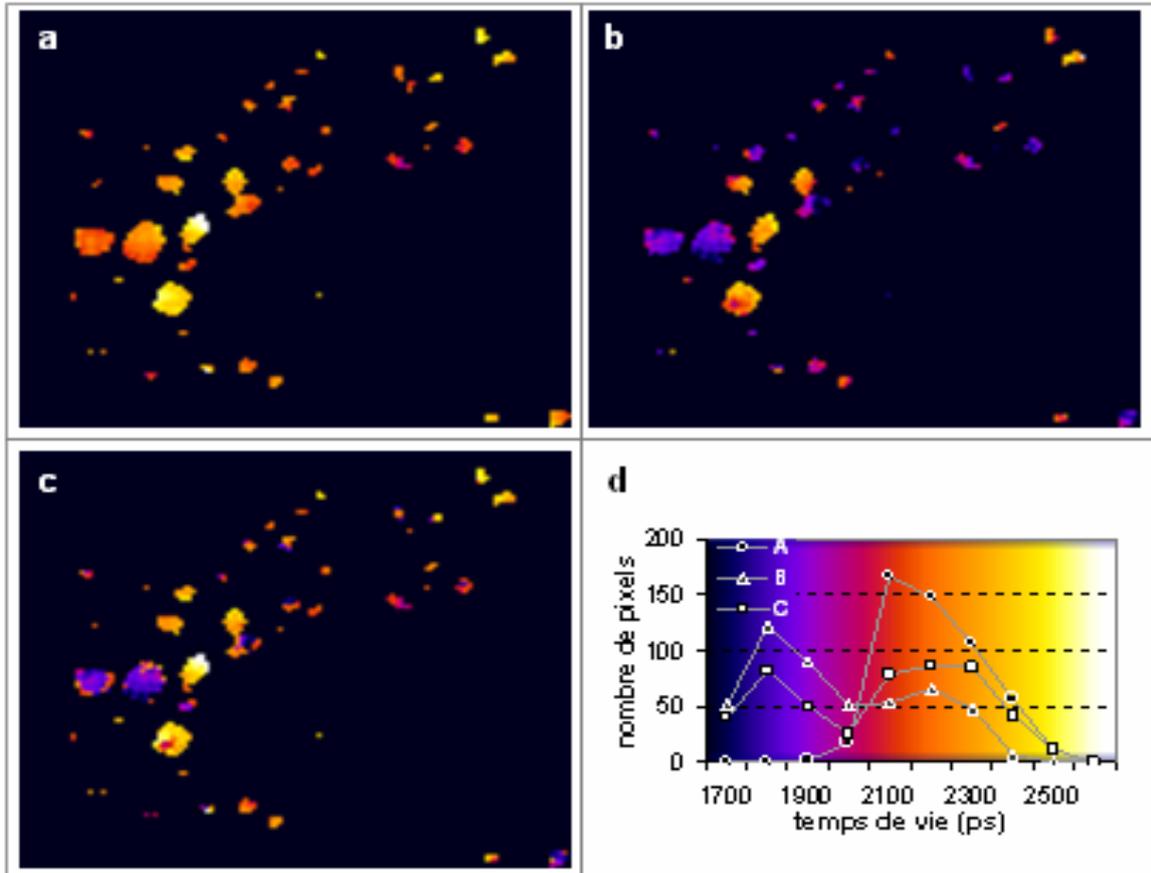
70 : Mêmes cellules que dans la figure précédente avec: **a**, ajustement mono-exponentiel ; **b**, ajustement bi-exponentiel ; **1**, images de temps de vie ; **2**, images de  $\chi^2$

Pour ce faire, nous avons développé un algorithme qui a été implémenté dans un plugin Java pour ImageJ (NIH, public domain software). Ce dernier va nous permettre un choix de modèle automatique dont la qualité sera comparable à une analyse point par point. Son fonctionnement est détaillé figure 71

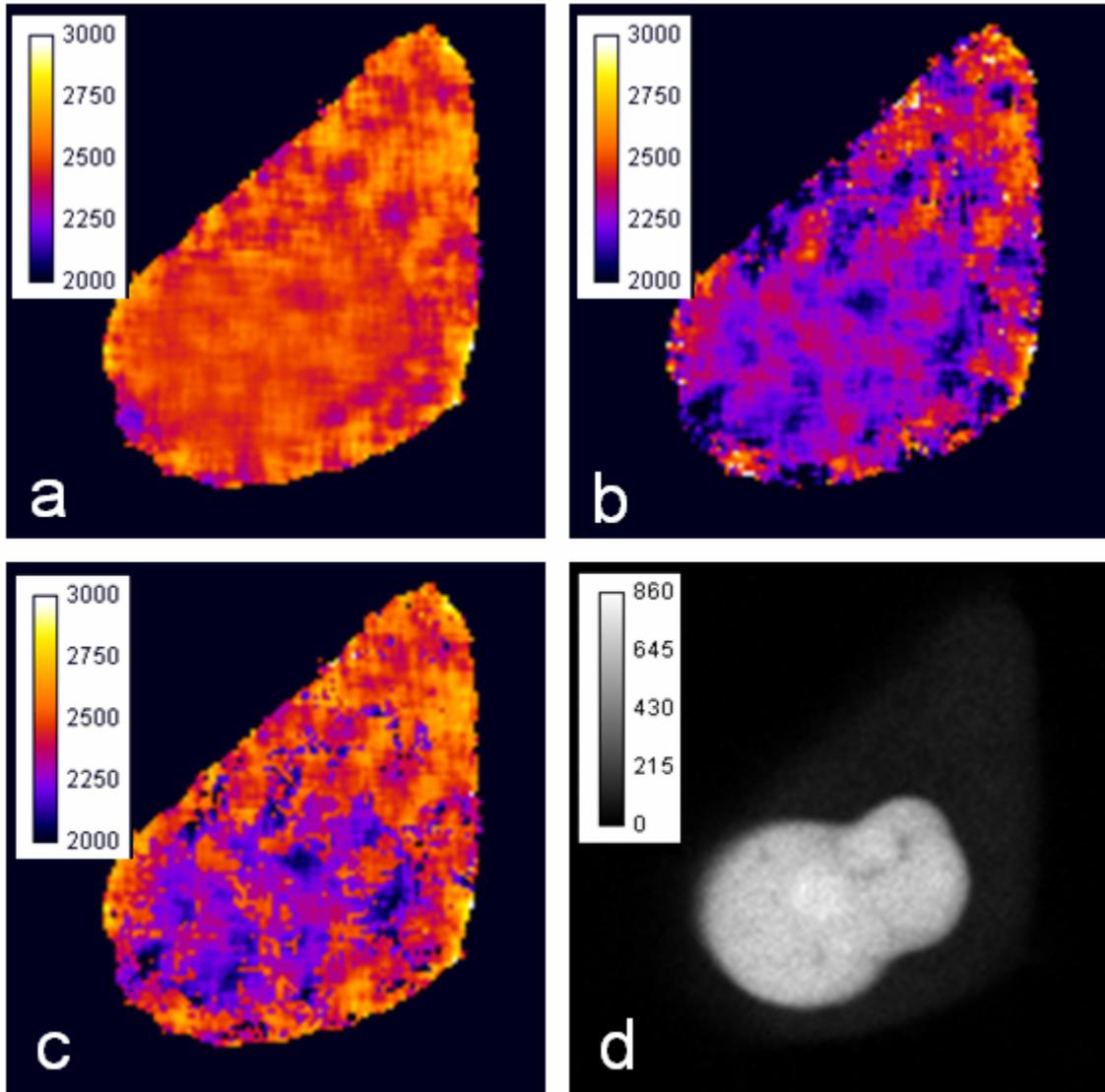


71: Histogramme logique de fonctionnement de notre algorithme de choix du modèle d'ajustement

Tout d'abord, un seuil est appliqué pour n'analyser que les pixels présentant suffisamment de photons ( $10^3$ ). Ensuite, un deuxième seuil permet de déterminer les pixels qui peuvent être ajustés avec un modèle bi-exponentiel ( $10^4$  photons). Enfin, pour chaque pixel restant, le calcul du  $\Delta$  est fait sur les valeurs de  $x^2$  avec un seuil réglable. Si  $\Delta$  est inférieur à 30%, la valeur de temps de vie à ajustement mono-exponentiel est conservée ; dans le cas contraire, c'est le temps de vie après ajustement bi-exponentiel qui le sera. Les différentes images de temps de vie sont alors ajoutées pour reconstituer l'image totale. Ce traitement a été appliqué sur l'image de protéine rab précédemment évoquée et donne les résultats présentés figure 72. Comme nous le voyons, l'image finale est bien composée de zones présentant un déclin mono-exponentiel et d'autres présentant des déclins bi-exponentiels. De plus, la distribution des temps de vie, et donc des niveaux d'interactions dans la cellule est très différente en fonction du modèle d'ajustement choisi. Un ajustement mono-exponentiel fait complètement disparaître la population aux temps de vie les plus courts (1.7 ns à 2.1 ns), alors que l'ajustement bi-exponentiel se traduit par une surestimation de cette sous population. Nous avons également utilisé ce système sur de précédentes acquisitions. Par exemple, les images de temps de vie mesurées sur les cellules Hela exprimant Jun-CFP et Erg-YFP (figure 73) et traitées en fonction de  $\Delta$  donnent des informations complémentaires sur la localisation des interactions. En particulier, on observe une localisation exclusive des interactions au niveau du noyau avec une exclusion du cytoplasme. La texture de ces interactions au sein du noyau est par ailleurs plus contrastée ce qui ouvre la voie à une étude fonctionnelle de leurs localisations.



72: Appareil de Golgi dispersé d'une cellule HeLa exprimant deux protéines rab présenté figure 69-70 (a)-(c) images de temps de vie moyens exprimés en ps pour différents ajustements : (a) mono-exponentiel. (b) bi-exponentiel. (c) mono ou bi-exponentiel en fonction de  $\Delta$ . (d) distribution des temps de vie moyens en fonction des modèles d'ajustements et légende associée.



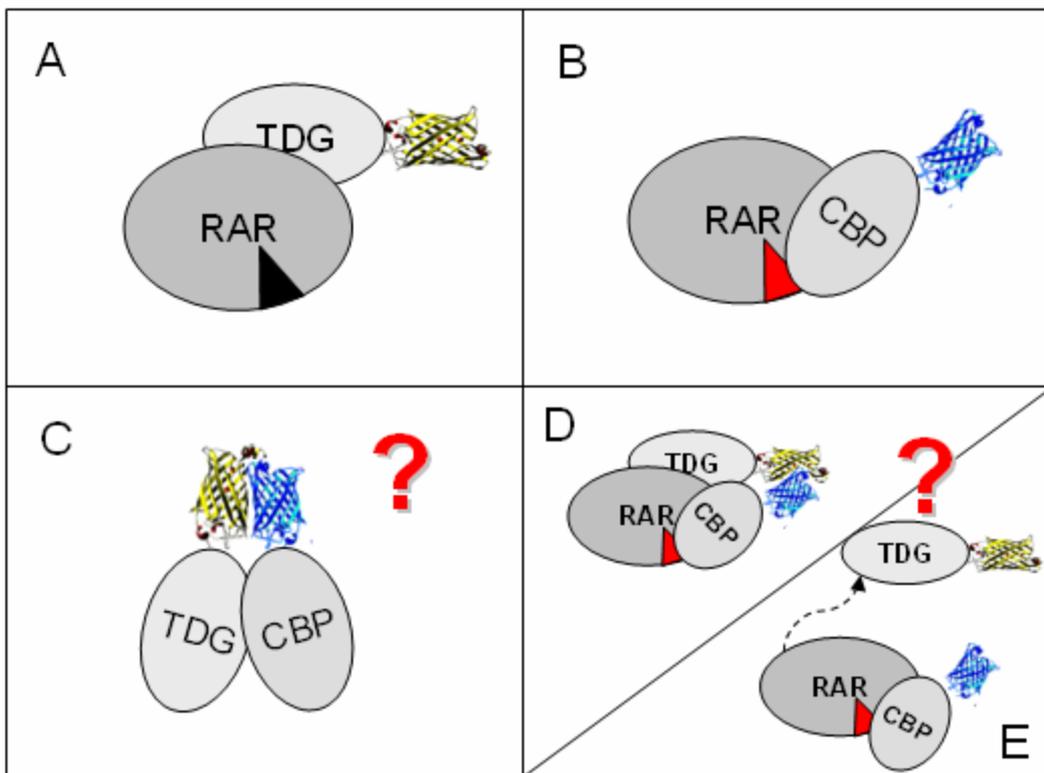
73 . Cellule Hela exprimant Jun-CFP et Erg-YFP(a)-(c) images de temps de vie moyens exprimés en ps et légende associée pour différents ajustements : (a) mono-exponentiel. (b) bi-exponentiel. (c) mono ou bi-exponentiel en fonction de  $\Delta$ . (d) nombre de photons par pixel.

### c Etude du complexe CBP-TDG

#### i) CBP/TDG et récepteur à l'acide rétinoïques (RAR)

Comme nous l'avons discuté dans l'introduction, TDG peut se lier au facteur de transcription RAR sans stimulus extérieur. CBP peut quant à lui se lier à RAR, en présence d'acide rétinoïque. Différentes hypothèses peuvent alors être envisagées, qui sont décrites figure 74 :

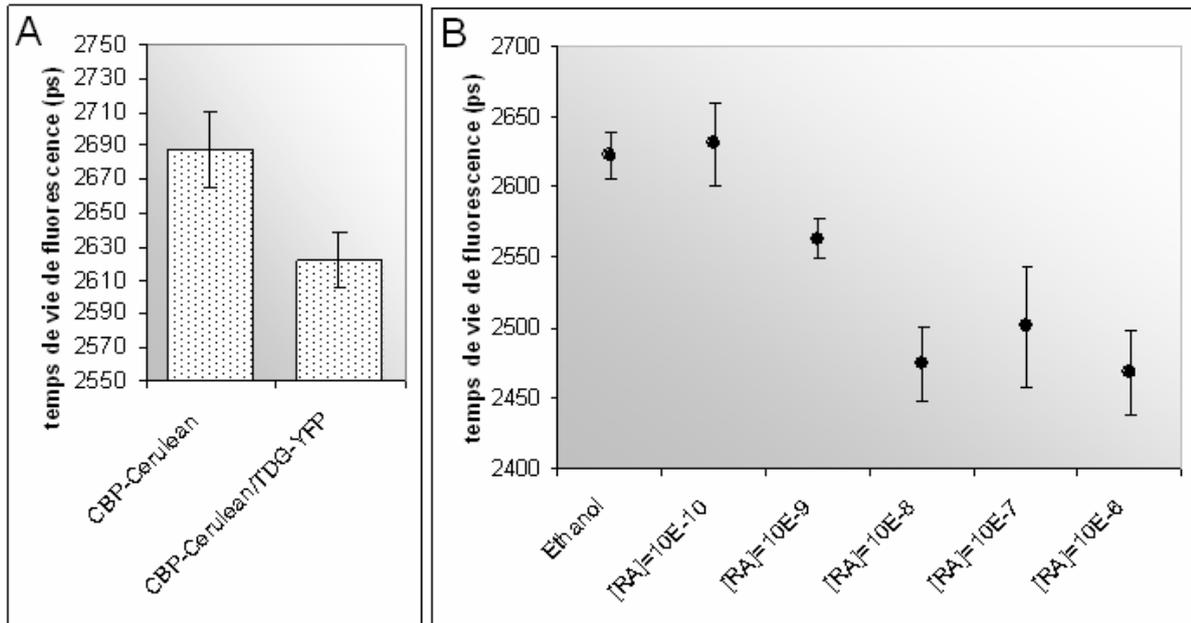
- **A** : TDG et RAR interagissent sans intervention d'un ligand.
- **B** : CBP et RAR interagissent après fixation de l'acide rétinoïque RA sur RAR
- **C** : CBP et TDG interagissent de façon directe dans la cellule
- **D** : Lorsque CBP s'associe à RAR, TDG reste associé à CBP, les trois éléments étant alors membres du même complexe (hypothèse 1).
- **E** : l'interaction de CBP avec RAR dissocie TDG (hypothèse 2).



74: représentation schématique des interactions possibles entre CBP/TDG/RAR (Voir le texte pour plus de détails)

Pour tester l'hypothèse selon laquelle CBP et TDG se lient de façon simultanée à RAR, nous avons exprimé dans des cellules COS-7 les protéines CBP-Cerulean et TDG-YFP. Nous avons ensuite traité ces cellules avec de l'acide rétinoïque (RA), qui va induire la liaison

entre CBP et RAR. Des mesures de temps de vies ont alors été réalisées sur la fluorescence émise par la CeruleanFP dans 30 cellules pour chacune des concentrations de RA testées. Les valeurs moyennes ainsi obtenues sont présentées figure 75



75: temps de vie moyen et intervalle de confiance (95%) associés mesurés sur :

**A** des cellules exprimant CBP-Cerulean ou CBP-Cerulean/TDG-YFP.

**B**, des cellules exprimant CBP-Cerulean/TDG-YFP, chaque série de cellules ayant été traitée en ajoutant au milieu de l'acide rétinoïque (RA) pour atteindre la concentration exprimée en Moles/L.

La première constatation à la vue de ce graphique est que le temps de vie mesuré dans les cellules exprimant CBP-Cerulean et TDG-YFP sans ajout d'acide rétinoïque (témoin éthanol) est inférieur au temps de vie du témoin négatif à savoir CBP-Cerulean seule. Cette observation suggère un niveau basal d'interaction entre CBP et TDG qui peut être dû soit à une interaction directe entre ces deux partenaires comme suggéré in vitro, soit à la présence de RA endogène dans la cellule. On remarque ensuite une diminution sigmoïde du temps de vie de la Cerulean en fonction de la dose de RA ajoutée au milieu. Ce type de réponse est caractéristique de la réponse de RAR à la présence de RA. De plus, la concentration à la mi-hauteur de la sigmoïde ( $10^{-9}$ M) correspond à la constante d'affinité de RAR pour RA. CBP interagissant de façon ligand dépendant avec RAR, on peut en déduire que la concentration croissante de RA induit une plus forte proportion d'interactions CBP/RAR. Cette dernière se traduisant par une diminution du temps de vie de la Cerulean, et donc une augmentation de l'interaction CBP/TDG. Cette expérience confirme donc l'hypothèse n°1 selon laquelle CBP TDG et RAR s'associent pour former un seul complexe après induction par l'acide rétinoïque.

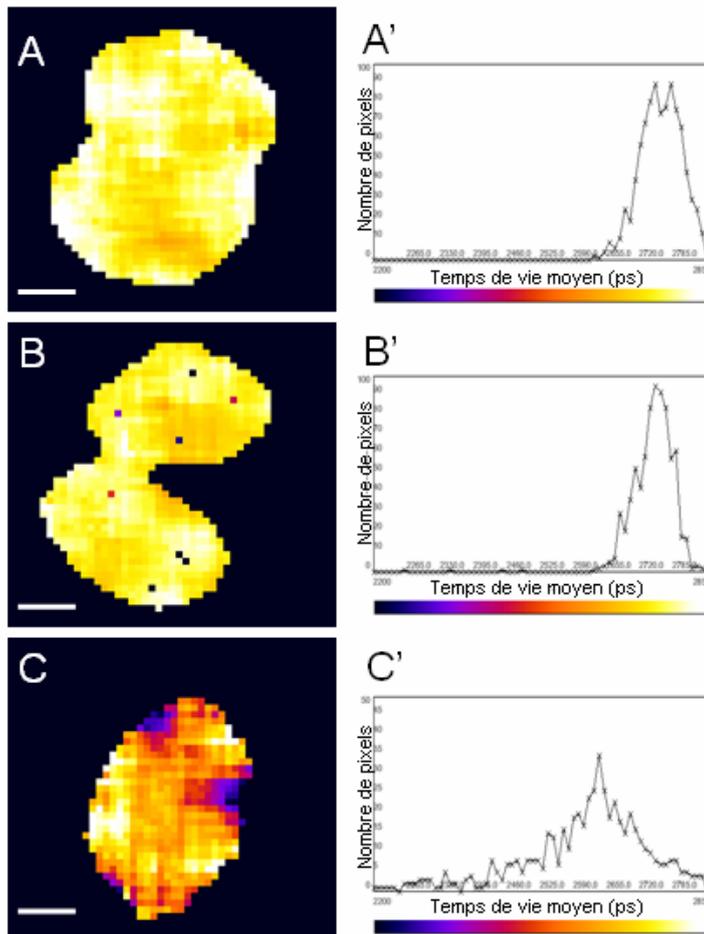
## ii) CBP TDG et SUMOylation

Nous avons ensuite voulu comprendre le mode d'action de la SUMOylation covalente de TDG sur la constitution du complexe CBP/TDG. Pour cela, nous avons utilisé un mutant de TDG (TDG<sub>K330</sub>) sur la lysine 330 qui a perdu sa capacité à être SUMOylée.

Nous avons donc réalisé des images de temps de vie sur des cellules CHO exprimant

- (A) CBP-Cerulean (témoin négatif de FRET)
- (B) CBP-Cerulean/TDG-YFP (niveau d'interaction basal, CBP/TDG)
- (C) CBP-Cerulean/TDG<sub>K330</sub>-YFP (effet de l'absence de SUMOylation sur l'interaction CBP/TDG)

La figure suivante donne une image typique de chacune de ces séries d'acquisitions ainsi que la distribution des temps de vie pour chacune des cellules.



76 : Images de temps de vie de fluorescence (gauche) et distribution des temps de vie associée à chaque image (droite) représentée entre 2200ps (violet) et 2850 ps (blanc) Mesures réalisées sur une cellule CHO exprimant

A et A' : CBP-Cerulean seule

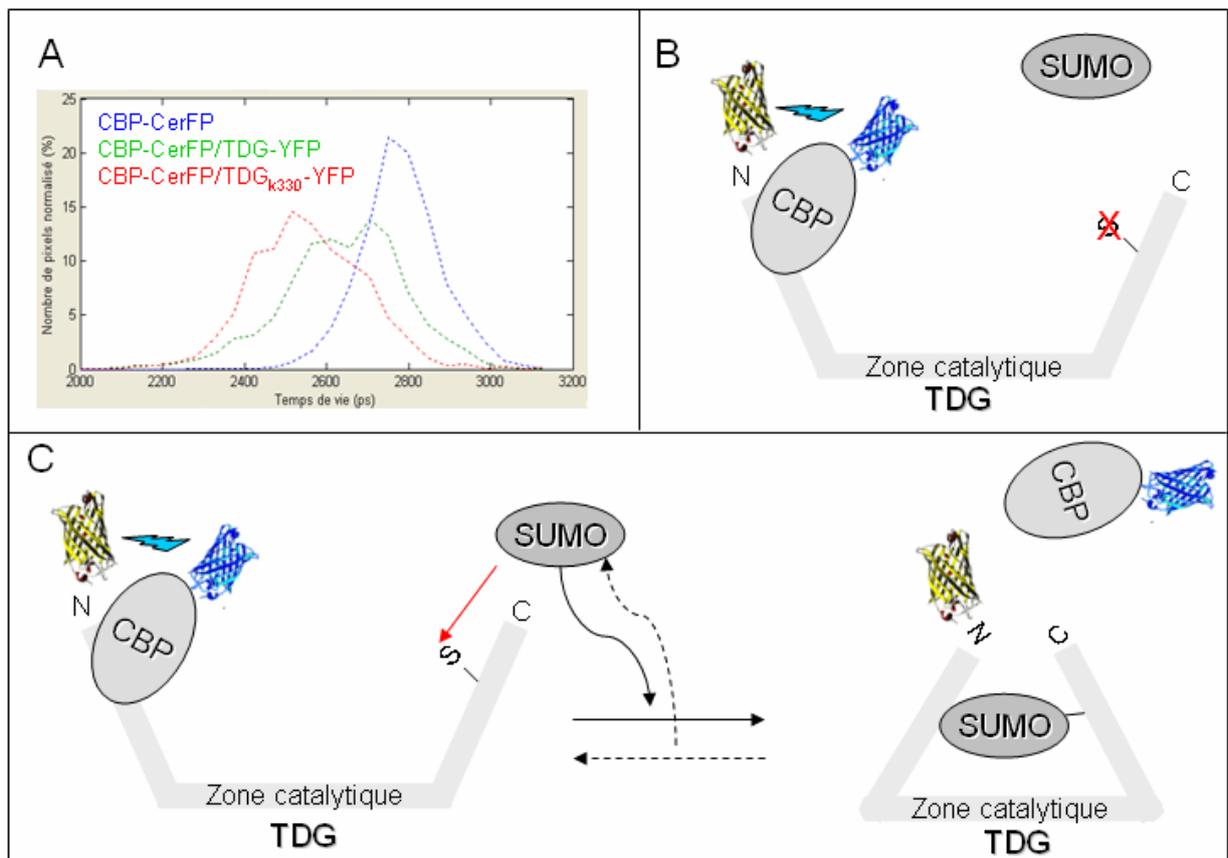
B et B' : CBP-Cerulean et TDG-YFP

C et C' : CBP-Cerulean et TDG-K330-YFP

Barre d'échelle : 5μm

Le choix entre un modèle d'ajustement mono-exponentiel et bi-exponentiel a été fait pixel par pixel conformément à la méthode décrite dans le chapitre précédent.

Ces mêmes acquisitions ont été réalisées sur 30 cellules par condition et le temps de vie moyen de chaque pixel a été extrait et accumulé dans un histogramme (figure 77 A). Les acquisitions réalisées sur (A) donnent un temps de vie de référence pour la Cerulean de 2750+/-30 ps. Cette valeur est légèrement supérieure à celle trouvée lors de nos acquisitions ponctuelles. Cette modification de 50 ps peut être justifiée par des conditions d'acquisition légèrement différentes et par l'imprécision du système de mesure au regard des statistiques de photons utilisées (de l'ordre de  $10^3$  photons crêtes pour 256 canaux temporels.). Les mesures réalisées sur les cellules exprimant CBP-Cerulean/TDG-YFP présentent une légère diminution du temps de vie de fluorescence (2620+/-40) confirmant le niveau d'interaction



77: Synthèse des mesures de temps de vie réalisée en vue d'étudier l'effet de la SUMOylation sur l'interaction CBP/TDG

**A** : Distribution des temps de vie moyens mesurés sur chaque pixel des images de temps de vie (30 cellules par conditions)

**B et C** : proposition de modèles d'interaction entre CBP/TDG/SUMO (Voir le texte pour plus de détails).

précédemment observé entre CBP et TDG. Enfin, après mutation du site 330, on obtient pour l'échantillon (C) un temps de vie de 2550+/-35ps, correspondant à une augmentation du niveau d'interaction entre CBP et TDG en l'absence de SUMOylation de TDG. L'ensemble

de ces données est présenté figure 77 A. Les parties 77 B et C présentent deux modèles fonctionnels proposés à partir de ces variations de temps de vies.

La zone d'interaction entre CBP et TDG ayant été caractérisée en position N terminale du site catalytique et la zone d'interaction covalente entre TDG et SUMO en position C terminale de cette même zone, nous proposons que la SUMOylation de TDG entraîne un changement de conformation de TDG, le rendant impropre à l'interaction avec CBP. Une mutation dans cette zone d'interaction entre SUMO et TDG (représentée par S, figure 77) augmenterait donc la proportion de protéine TDG présentant une conformation favorable à une interaction avec CBP, expliquant par là même l'augmentation du niveau d'interactions entre ces dernières. La confirmation de cette hypothèse nécessite l'utilisation d'autres techniques telles les mesures de RMN qui sont actuellement réalisées par Caroline Smet (*IRI, Lille*).

Au delà de cette information moyenne sur l'évolution des temps de vie, la figure 76 C présente une forte hétérogénéité des niveaux d'interactions dans la cellule, le temps de vie moyen variant entre 2300 et 2850ps. Cette dispersion est nettement supérieure à la dispersion observée pour les deux autres expériences avec les mêmes cellules et ne résulte donc ni de la variabilité de l'environnement cellulaire ni de l'imprécision de notre système de mesure. De plus, ce temps de vie variable au cœur du noyau semble structuré en compartiments situés à proximité de l'enveloppe nucléaire, et non distribué de façon aléatoire, confirmant la possibilité d'une signification structurale de niveaux d'interaction variables. L'exploitation de ce type de résultats reste à entreprendre ; elle nécessitera des co-marquages permettant d'identifier les compartiments en question.

### ***iii) Bilan***

Les différentes études entreprises apportent des informations nouvelles sur l'interaction entre CBP TDG et RAR (figure 78). Cette étude soulève également de nombreuses questions, que ce soit au niveau de la localisation préférentielle ou encore des mécanismes moléculaires mis en œuvre. Comme nous l'avons vu, des approches complémentaires comme la RMN nous permettront de mieux comprendre cette machinerie moléculaire. De plus, une étude fonctionnelle est également en cours afin de déterminer l'effet de ces interactions sur les niveaux d'expression des gènes régulés par RAR (expériences réalisées par Amel Attmane, *IRI, Lille*). Enfin, nous avons étudié les interactions entre CBP et

TDG dans le cadre de la régulation de l'activité de RAR. Le rôle initialement identifié pour TDG étant la réparation des mésappariements G : T, nous avons également entrepris l'étude de la régulation de cette fonction par CBP, en particulier sur son rôle *in vivo* quant à la régulation du recrutement de l'apurinic endonucléase (APE) qui intervient dans la réparation du site abasique formé par l'action de TDG. Ces résultats étant encore en phase d'étude préliminaire, ils ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

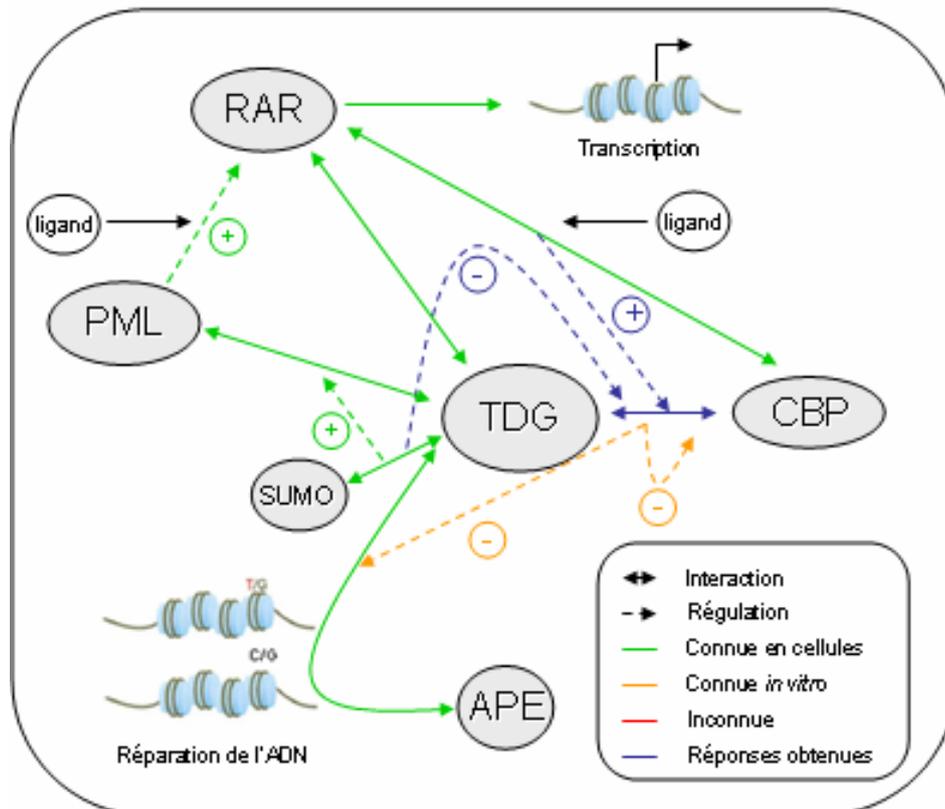


Figure 78 : mise en évidence des informations acquises au cours de cette étude sur les interactions entre CBP et TDG dans la cellule vivante.

### **III. Nouvelle instrumentation dédiée à l'acquisition de données de SLiM.**

*Les mesures de temps de vie de fluorescence en cellule présentent certaines contraintes quant à la complexité des courbes de décroissance obtenues et à la faible statistique de photons disponibles pour réaliser leurs ajustements. La fluorescence présentant d'autres caractéristiques, il est prévisible que le « couplage corrélatif des axes de mesures » apportera une redondance de l'information et comblera les manques de chacune des techniques. Le spectre de fluorescence est une dimension complémentaire particulièrement intéressante pour l'étude du FRET. Nous avons donc entrepris le développement d'un système permettant les mesures de spectre et de temps de vie de fluorescence ou SLiM*

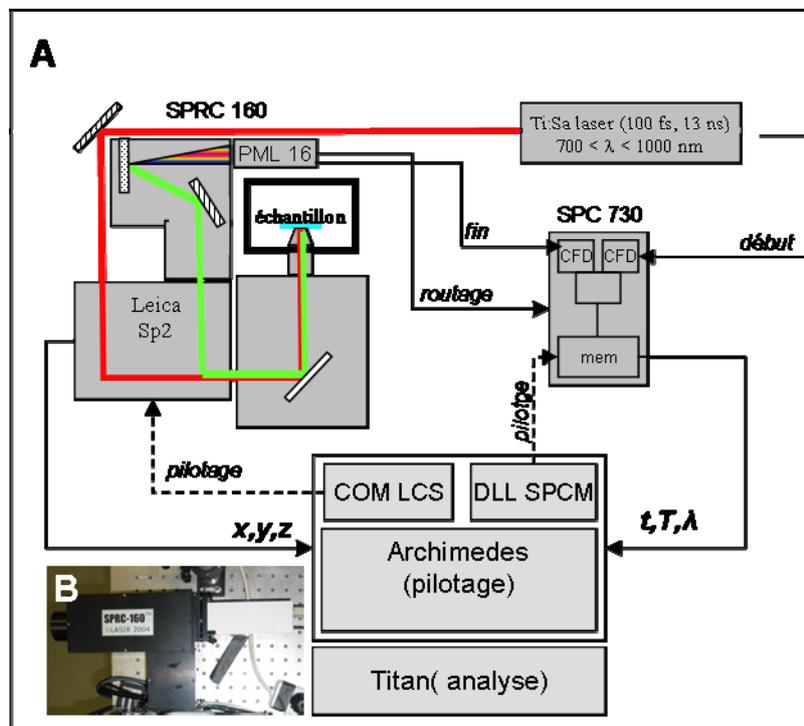
*Ce travail a donné lieu à deux publications et à été réalisé en cotutelle avec Jacques Barbillat (LASIR, UMR8516, Lille)*

## Section.1 Mise en œuvre du système

### a Description générale du système

Pour réaliser des mesures corrélées de spectre et de temps de vie de fluorescence (SLiM), différents éléments sont indispensables (figure 79) :

- un microscope confocal
- une source d'excitation pulsée
- un analyseur spectral
- un ou plusieurs détecteurs présentant une bonne réponse temporelle
- une ou plusieurs cartes de mesure de temps de vie (espace temporel ou fréquentiel)



79 (A) L'architecture logicielle et matérielle de notre système, (B) photographie du SPRC160. Voir le texte pour plus d'information sur les différents éléments.

Le système que nous avons développé s'articule autour du microscope confocal Leica SP2 équipé de la source pulsée Ti :Sa précédemment décrite. Nous avons préféré travailler avec un système TCSPC de mesure de temps de vie qui est le plus précis actuellement pour effectuer ce type de mesure. La carte Becker & Hickl SPC730 précédemment décrite a été utilisée pour réaliser ces mesures, cette dernière présentant une architecture mémoire

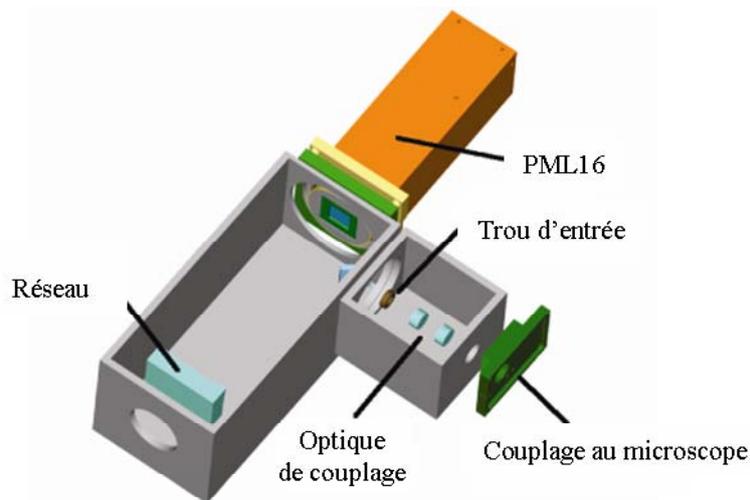
compatible avec des acquisitions de temps de vie associées à une autre dimension. Le scanner de microscope SP2 présentant une sortie descannée, nous avons choisi d'y adapter directement le spectrographe que nous avons développé, le SPRC160. En évitant l'utilisation d'une fibre optique, nous limitons au maximum les pertes de fluorescence le long du trajet optique mais aussi une potentielle dégradation de la réponse instrumentale. Un logiciel, Archimedes, a également été développé au sein de notre équipe par *Dave Trinel*, pour assurer un pilotage conjoint du microscope confocal et de la carte de comptage de photons. Ce contrôle avancé du système nous permet d'utiliser des routines d'acquisition allant de l'image complète de SLiM à une imagerie bi-photonique associée à des mesures de SLiM localisées et répétées au cours du temps.

## b Le SPRC-160

Pour disposer d'une entrée fixe dans notre spectrographe, ce dernier a été positionné en position descannée du microscope. Le passage des photons par le système de balayage réduit le nombre de photons émis qui atteignent le SPRC-160. Une de nos préoccupations principales, lors de la conception du SPRC-160, a été de minimiser la perte de photons. Pour cela, nous avons limité au maximum les pièces optiques composant notre système.

### i) Description du système de mesure de SLiM

L'angle solide du faisceau lumineux émergent du scanner ( $\alpha \sim 3^\circ$ ) étant différent de l'angle d'entrée du spectrographe ( $\alpha \sim 16^\circ$ ), nous avons donc utilisé une optique de couplage entre le « *pinhole* » de sortie du scanner et l'entrée du spectrographe (figure 80).



80: représentation 3D du SPRC160

Concrètement, la lumière en sortie de *pinhole* est colimatée par un doublet achromatique (DBL13944/100, JML Optical Industries, Inc) puis projetée par un second doublet (DBL14076/100, JML Optical Industries, Inc) sur le trou d'entrée du spectrographe. De cette façon, le faisceau entrant couvre parfaitement le réseau. Les photons entrant pourront alors être dispersés correctement sur le détecteur. Les deux doublets achromatiques ont été montés sur un système de translation XY maison conçu au LASIR.

Ces derniers peuvent également subir une translation en Z. Cet ensemble permet d'ajuster précisément le faisceau de sortie à notre fente d'entrée et assure la portabilité du système entre les microscopes Leica SP2, ces derniers présentant un réglage au niveau de la position apparente du *pinhole* et de l'angle de sortie du scanner.

Le spectrographe par lui-même est composé d'un réseau holographique concave (Ref. 53300100, Horiba group, Jobin & Yvon S.A.) et d'un miroir pour réduire l'encombrement spatial du système. Les réseaux concaves présentent de nombreux avantages par rapport aux réseaux plans classiques :

- Ils possèdent des propriétés d'imagerie et de dispersion spectrale.
- Le nombre de pièces optiques nécessaire à la construction du spectrographe est réduit.
- L'alignement optique est facile à réaliser.
- Les pertes d'énergie sont réduites.

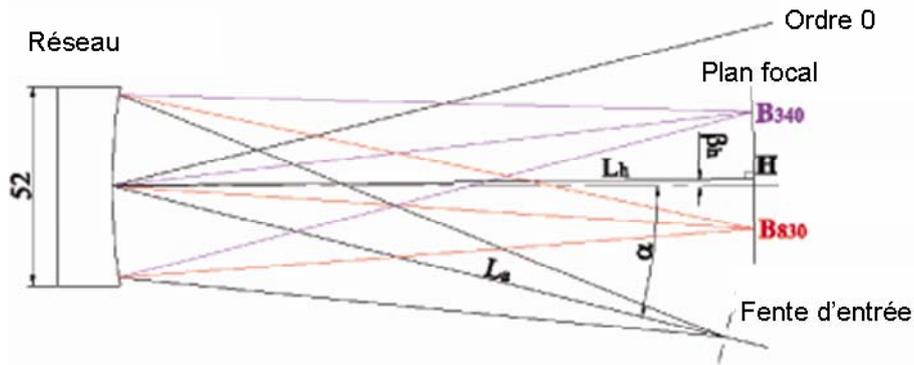
De par ce choix de réseau, aucun autre élément optique n'est nécessaire sur le trajet (comme par exemple une optique de focalisation entre le réseau et le détecteur.)

Le système résultant est alors très compact et réduit au maximum les pertes de photons.

### *ii) Le système de dispersion spectrale.*

Le réseau est le cœur du système de dispersion spectrale. Un réseau holographique est fabriqué en projetant des motifs interférentiels lumineux sur une surface recouverte d'une couche photosensible. Après exposition, un ensemble de lignes est gravé dans le film de surface qui recouvre la surface concave. Le faisceau dispersé peut alors être projeté sur un détecteur linéaire ou matriciel.

Le réseau que nous avons choisi présente 372 lignes/mm pour une surface de substrat de 52\*52 mm et un rayon de courbure  $R=168.73\text{mm}$ . Ce dernier est positionné comme illustré en figure 81 avec  $L_a= 163.91\text{ mm}$ ,  $L_h= 166.55\text{ mm}$ ,  $\alpha= - 13.981^\circ$ ,  $\beta_h= 0.62^\circ$ .



81: configuration du réseau holographique concave.

Ce réseau disperse la lumière entre 340 nm et 830 nm sur un plan de 30.5 mm pour une dispersion moyenne de 16 nm/mm. Comme nous le verrons par la suite, cette résolution spectrale est un bon compromis entre information et nombre de photons requis pour effectuer des expériences de SLiM.

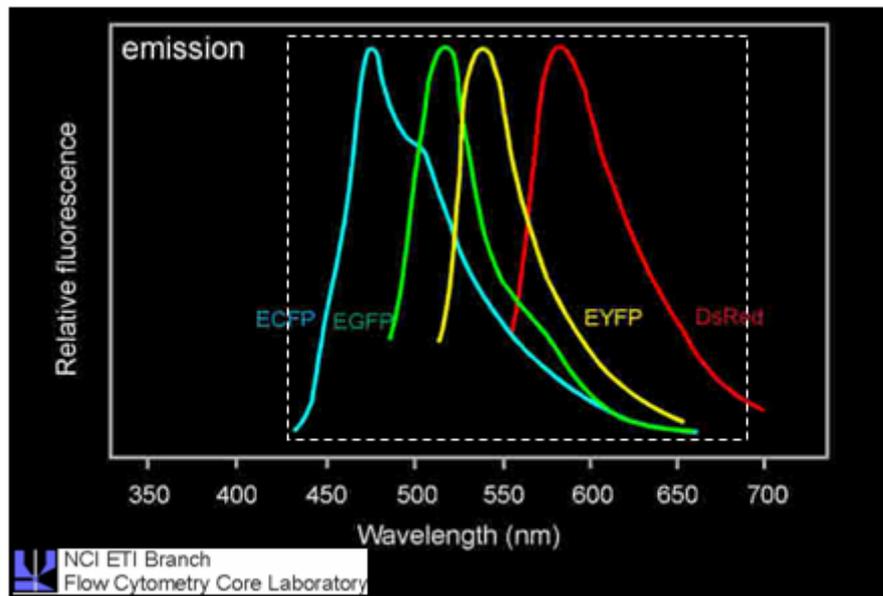
$\lambda$ (nm)	Dispersion (nm/mm)	FWHM (nm)	$HB_\lambda$ (mm)
340	15.9	3.95	17.480
462	16.0	3.47	9.833
585	16.1	3.74	2.192
708	16.1	3.41	-5.431
830	16.0	4.12	-13.020

Table 1: caractéristique dispersive du réseau concave du SPRC160.= avec  $HB_\lambda$  la distance entre H (défini figure 81) et la ligne spectrale correspondante.

La photocathode du détecteur multi-anodes que nous avons choisi (R5900U-L16, Hamamatsu) étant large de 15.8 mm, il est impossible de collecter la totalité du spectre de fluorescence. Nous avons utilisé les données théoriques de dispersion spectrales fournies par Jobin & Yvon (table 1) pour ajuster au mieux la position relative de notre détecteur par rapport au réseau.

Nous avons choisi de positionner le détecteur de sorte qu'il collecte la fluorescence entre 430 nm et 685 nm. En effet, cette gamme spectrale nous permet d'aborder la majorité des questions rencontrées lors d'étude de FRET, les longueurs d'onde d'émission des principaux donneurs et accepteurs (CFP/YFP GFP DsRed et leurs variants) se situant

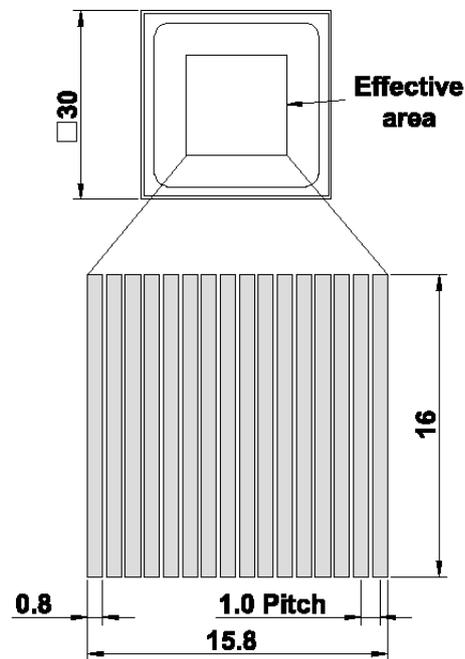
dans cette gamme (figure 82). Le système a cependant été conçu de façon flexible au niveau de la plage d'observation. Ainsi, plutôt que d'utiliser un positionnement fixe de notre détecteur, nous avons conçu des interfaces de positionnement du détecteur. 2 interfaces ont été réalisées en plus de celle initialement décrite, nous permettant une observation dans la fenêtre 305-560 nm pour la première et 558-814 nm pour la seconde. Cette modification est simplement due à une translation du détecteur. Il est donc très simple d'usiner une pièce s'adaptant parfaitement à une condition d'expérience spécifique.



82: spectres d'émission des principales molécules utilisées pour les études de FRET associés à la fenêtre d'observation spectrale, représentée par les pointillés blancs, du SPRC-160 dans sa configuration initiale. (Images modifiées à partir de <http://home.ncifcrf.gov/ccr/flowcore/Spectra/FPspec.htm>)

### ***iii) Le détecteur multi-anodes : le PML16***

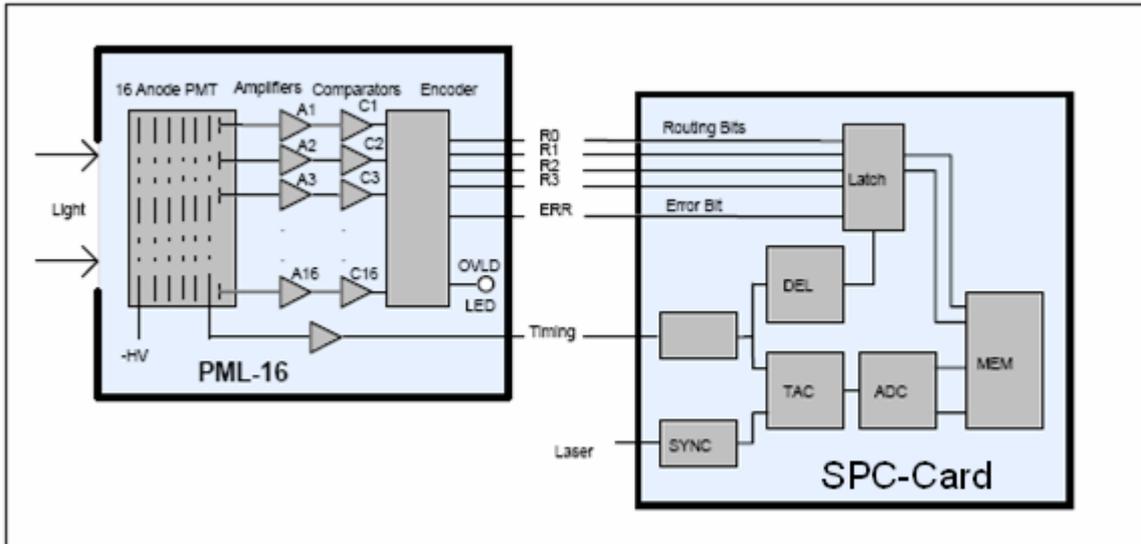
Les expériences de TCSPC requièrent un détecteur présentant une réponse instrumentale suffisamment courte pour résoudre des temps de vie de l'ordre de 100ps à 5 ns. Ces mêmes contraintes devront être respectées pour les mesures de SLiM, mais sur plusieurs détecteurs, ou un détecteur multi-anodes couplé à un système de routage. Le PML16 contient un tube photomultiplicateur multi-anodes (Hamamatsu R5900U-L16) composé de 16 canaux séparés ( $0.8 \times 16 \text{mm}^2$ ) avec une distance de 1mm entre chaque canal (« Pitch ») et un passage inférieur à 3%. L'architecture de ce détecteur est présentée figure 83.



*83: architecture du photomultiplicateur multi-anodes*

Ce système présente une réponse instrumentale inférieure à celle d'un détecteur de type MCP (voir chapitre II.1.c) dont la FWHM est de l'ordre de 30 ps. Son temps de réponse est cependant très suffisant pour réaliser des expériences de FLiM (valeurs typiques : temps de montée des anodes : 600 ps, FWHM : 250ps).

Le PML16 est utilisé conjointement avec la carte SPC 730 précédemment décrite (chapitre II.1.b), qui permet la mesure simultanée de 16 courbes de déclin associées à une information de routage grâce à une électronique intégrée (figure 84).



84: schéma logique de communication entre l'électronique du PML16 et des cartes SPC B&H (modifié depuis la documentation du PML16, B&H)

En effet, chaque anode est associée à un amplificateur (A1-A16), lui-même relié à un comparateur (C1-C16). L'ensemble des comparateurs est relié à un encodeur. Lorsque qu'un photon frappe la photocathode, deux signaux vont en résulter :

- le premier est l'information de temps d'arrivée du photon (Timing)
- le deuxième correspond à l'information de routage. L'amplificateur et le comparateur correspondant à l'anode de mesures envoient alors un signal à l'encodeur. Ce dernier convertit cette information en 4 canaux d'information binaire codant pour les 16 canaux ( $2^4=16$ ).

L'ensemble de ces informations est alors injecté dans la carte SPC730, puis stocké en mémoire en fonction de son temps d'arrivée, de son anode d'origine et de sa position x ,y.

#### ***iv) Logiciels d'acquisition et d'analyse***

Pour réaliser ces acquisitions multi variées, un pilotage simultané et synchronisé des différents éléments matériels composant notre système d'acquisition est indispensable. Le scanner du Leica SP2 possédant une sortie « trigger out » et la carte SPC730 une entrée « trigger in » de synchronisation, il est possible de synchroniser ces deux systèmes facilement pour les routines d'acquisition les plus simples.

Cependant, pour des routines plus complexes, comme l'alternance d'acquisition d'image 2-photons et de mesures de SLiM localisées, ce type de synchronisation se révèle insuffisante. Nous avons donc développé au sein du laboratoire un logiciel de synchronisation et de pilotage, Archimedes (*D.Trinel*) qui permet d'optimiser nos routines d'acquisition. Ce logiciel utilise une communication réseau entre les deux ordinateurs assurant le pilotage. Pour cela, trois technologies de communications sont utilisées :

- la Class Socket, basée sur la technologie TCP/IP qui permet la communication réseau par encapsulation de lignes d'information qui peuvent alors être échangées rapidement et de façon robuste entre deux ordinateurs.
- La fonction COM (Component Object Model) du logiciel LCS est utilisée pour le pilotage complet de la partie physique du confocal.
- Les DLL (Dynamic Link Library) SPC-DLL-M de Becker&Hickl sont utilisées pour allouer et libérer les blocs mémoires de la carte et pour initialiser la carte de comptage SPC 730)

Dans un premier temps, les courbes de déclin sont analysées en utilisant le logiciel SPCImage. Les données sont alors ajustées en utilisant un déclin à une ou deux exponentielles (Eq. 2)

La mise en forme des expériences de SLiM est obtenue grâce à un logiciel maison, Titan (C.Spriet, D.Trinel) développé en utilisant Matlab (© COPYRIGHT 1984-2006 by MathWorks, Inc.) et le langage de programmation C++

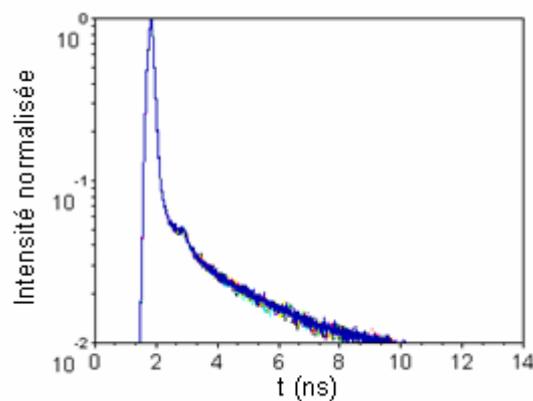
## **Section.2      *Caractérisation du système de mesure de SLiM.***

### **a    Mesure de la fonction de réponse de l'instrument (IRF)**

Deux solutions existent pour réaliser des mesures d'IRF :

- réaliser des mesures de fluorescence sur des espèces présentant un temps de vie négligeable par rapport à une IRF classique du détecteur étudié
- observer la génération de seconde harmonique, processus instantané dont la longueur d'onde d'émission est égale à la moitié de celle d'excitation.

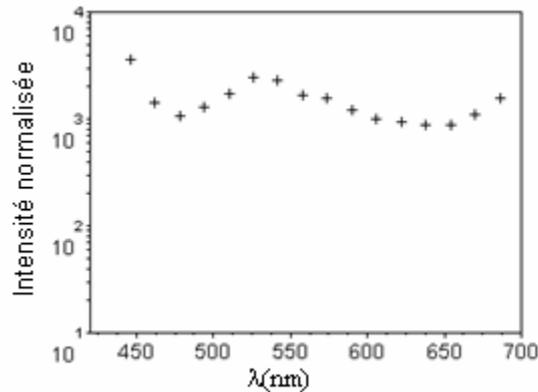
Pour effectuer ce type de mesure sur l'ensemble de notre détecteur, nous pouvons effectuer une translation de notre détecteur sur le plan de focalisation du réseau et mesurer de la seconde harmonique ou utiliser un fluorophore à temps de vie courte et à spectre d'émission très large. Pour des raisons de simplicité, la deuxième solution est préférable. En effet, une mesure réalisée sur de l'acide picrique permet de déterminer l'IRF de tous nos canaux. La FWHM ainsi mesurée est de  $171 \pm 2$  ps pour l'ensemble du détecteur. Cette mesure est très reproductible pour chaque canal, comme le montre la figure 85.



*85: 10 mesures d'IRF réalisées sur le deuxième canal du SPRC160*

## b Mesure du bruit du système.

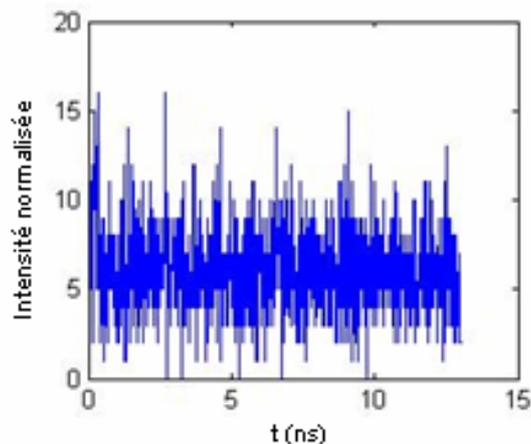
Le bruit global de notre système a été mesuré pour la totalité du système (bruit du détecteur, de l'électronique et lumière résiduelle de la pièce) en réalisant 360 acquisitions de 10 secondes sans échantillons sur le microscope. (Figure 86)



86: bruit du système en fonction de la longueur d'onde

Le système présente un bruit sensiblement différent en fonction du canal spectral étudié. Cependant, cette valeur est parfaitement stable et reproductible au cours du temps. Il est donc possible de corriger pour chaque canal la contribution relative du bruit en fonction du temps total d'acquisition. Les courbes présentées dans la suite de ce travail ont été corrigées pour ce bruit variable.

L'observation des données dans les 1024 canaux temporels est quant à elle parfaitement linéaire, mis à part de très légères déviations en début de courbes de déclin. Cette déviation due à la rampe de TAC (voir description de la carte SPC 730) ne pose pas de problème pour nos analyses, cette zone de courbes n'étant pas utilisée pour l'analyse de nos données.



87: bruit du système en fonction du canal temporel.

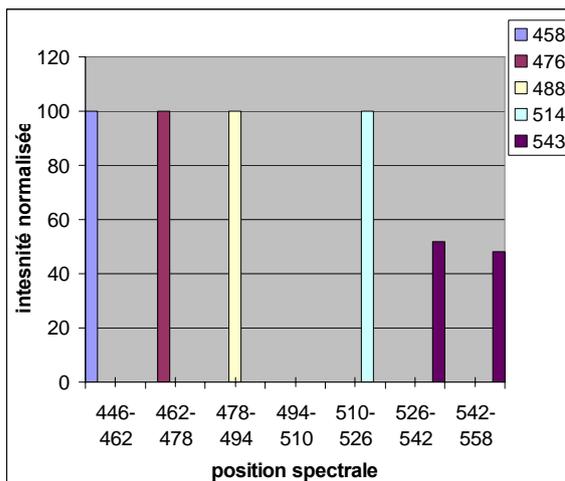
### c Calibration spectrale.

La calibration spectrale a été réalisée en trois temps en utilisant la monture initiale de notre détecteur.

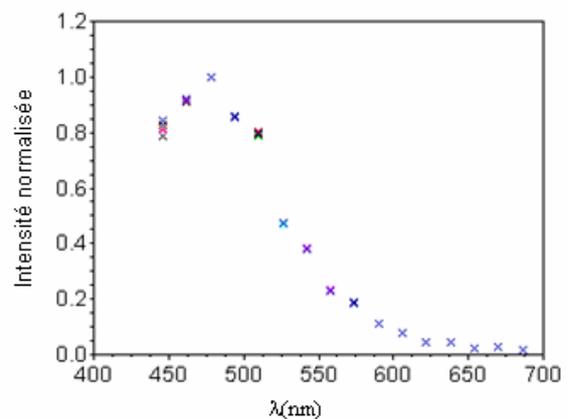
Tout d'abord nous avons déterminé précisément la position du premier canal du SPRC160. Pour cela, nous avons excité des cristaux d'hydroxy-urée à des longueurs d'ondes comprises entre 850 et 950nm avec des pas de 10 nm. La seconde harmonique ainsi générée entre 425 et 475 nm a permis de confirmer les valeurs théoriques de position du premier canal dont les bornes se situent à 446 et 462 nm. La valeur de dispersion du réseau fournie par le constructeur permet d'estimer une fenêtre totale d'observation pour le SPRC160 de 446 à 702 nm avec une largeur de canal de 16 nm.

Nous avons ensuite voulu confirmer le niveau de dispersion de notre système en mesurant la réflexion des lasers visibles du Leica SP2 sur une lame de verre (85) les valeurs obtenues sont présentées figure 88. Les raies lasers se situent bien dans la zone théorique. En particulier, la raie à 453 nm se situe à la limite de deux canaux. Cette dernière étant plus large que le nm de séparation, elle se retrouve dans les deux canaux concernés.

Enfin, la reproductibilité des mesures de spectre a été testée sur des solutions d'acide picrique, les mesures étant effectuées à plusieurs jours d'intervalle. Les mesures ainsi réalisées (figure 89) confirment la stabilité de notre système.



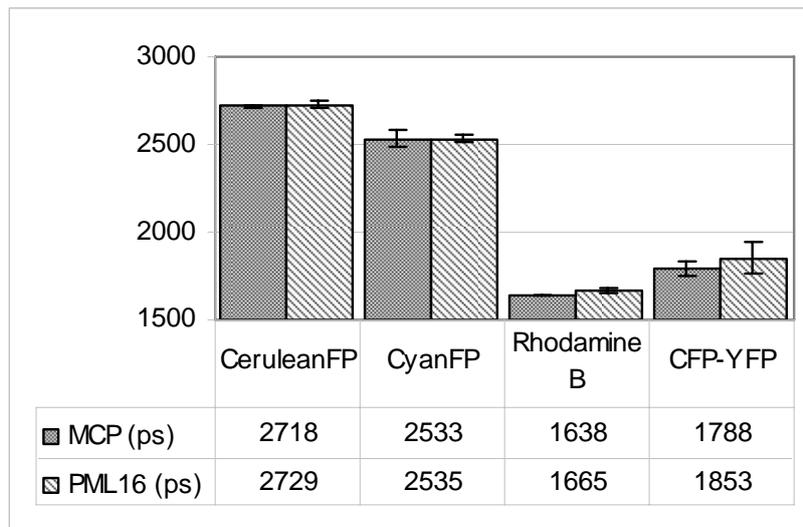
88: Position des différentes raies laser du Leica SP2 mesurées sur le SPRC160



89: reproductibilité des mesures de spectre faites sur une solution d'acide picrique

#### d Calibration des mesures de temps de vie.

Le microscope dont nous disposons au laboratoire comporte deux systèmes de mesures de temps de vie présents sur deux ports de sortie différents : le système MCP précédemment décrit et caractérisé et le SPRC160. Il nous est donc possible de réaliser des mesures de temps de vie avec les deux systèmes et de comparer les résultats ainsi obtenus. Nous avons réalisé des mesures sur différents échantillons de référence avec nos deux systèmes. L'ensemble des résultats est résumé figure 90



90: mesures de temps de vie de fluorescence de différents échantillons de référence, mesurées grâce au MCP et au PML16.

Nous avons tout d'abord effectué des mesures sur la rhodamineB en solution aqueuse afin de déterminer la capacité du système à résoudre des déclins mono-exponentiels en solution. Nous avons ensuite réalisé les mêmes mesures sur des cellules exprimant de la CeruleanFP ou de la CFP, ces deux protéines étant les deux que nous avons le plus utilisées pour effectuer nos expériences de FRET. Comme pour la rhodamine, le temps de vie obtenu sur les deux systèmes est identique aux erreurs d'expérience près. Enfin, nous avons testé notre système sur une cellule exprimant la protéine CFP liée à la YFP et constituant un témoin positif de FRET multi- exponentiel. Une fois encore, les deux détecteurs donnent des résultats similaires, malgré une dispersion des résultats légèrement supérieure dans le cas du SPRC-160.

## **e Optimisation des conditions d'acquisition pour le travail en cellules vivantes.**

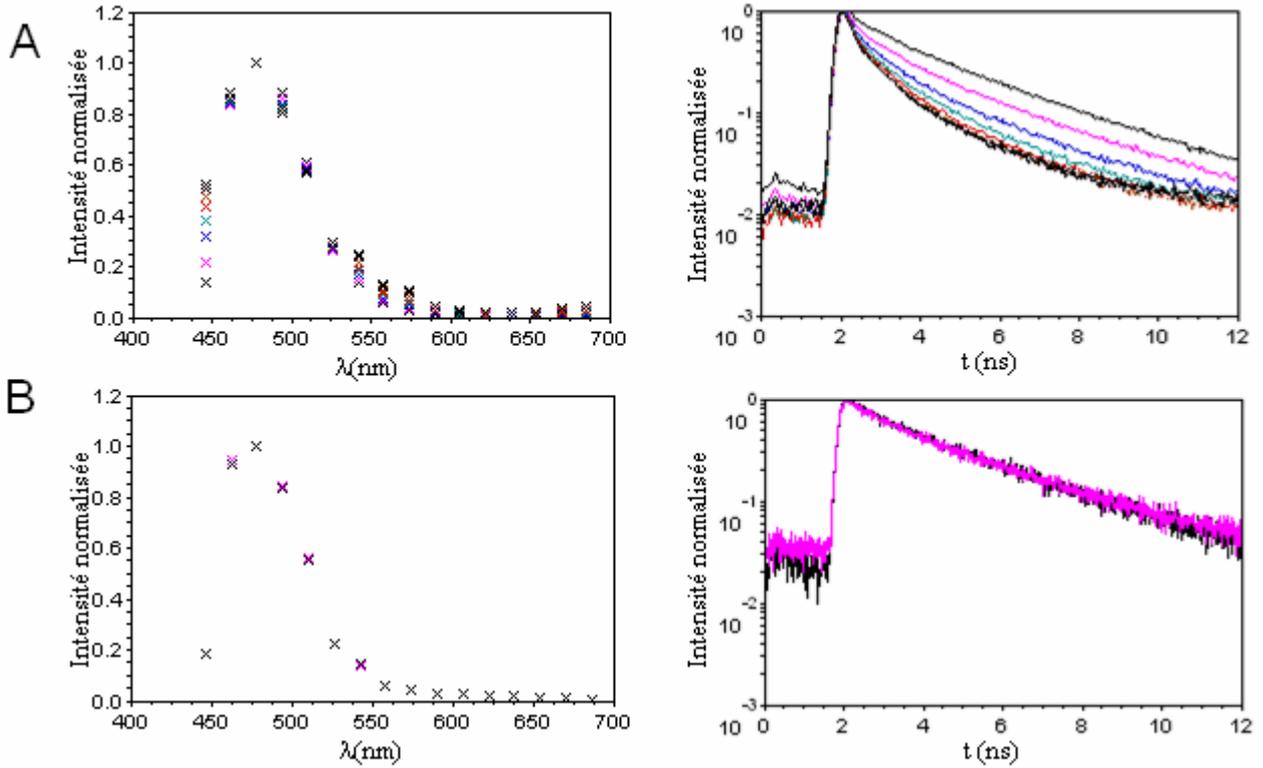
Deux éléments peuvent gravement altérer nos mesures de temps de vie en cellule vivante : les effets photo induits et l'apparition d'autofluorescence. Ces deux éléments peuvent résulter d'une excitation trop forte de notre échantillon. Il est donc indispensable de caractériser la puissance d'excitation maximale applicable à l'échantillon sans induire de perturbation. Ce type de mesure était déjà important pour les mesures de FLIM seule ; il devient critique pour les expériences de SLiM qui nécessitent généralement plus de photons pour être exploitables (*c'est la raison pour laquelle cette étape est présentée ici, bien qu'elle ait été réalisée pour chacune des expériences de FLIM réalisées au laboratoire*). Comme ces valeurs limites dépendent grandement de l'échantillon biologique étudié, il est important de mesurer ces valeurs au début de chaque nouvelle série d'expériences. Pour illustrer cet effet, voici deux conditions d'acquisition testées sur des levures *Saccharomyces* exprimant la protéine Ac1p-CFP.

- Une série de 120x20s d'acquisition,  $P= 3.45 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ .

La figure 91 A présente 8 de ces courbes espacées de 5mn chacune. La forte densité de photons « projetée » sur l'échantillon induit de forts effets photoniques (stress cellulaire, altération du fluorophore...) ainsi qu'un fort photoblanchiment (67% de diminution du nombre de photons comptés entre la première et la dernière mesure). Ces conditions d'acquisition induisent une forte variation au niveau de la courbe de déclin de la CFP, associée à une diminution de temps de vie de 2.5ns à 1.5ns, ainsi qu'une forte variation du spectre de fluorescence. Des conditions moins invasives doivent donc être utilisées pour ce modèle.

- Une série de 120\*10s d'acquisition,  $P=0.13\text{mW}/\mu\text{m}^2$

La figure 91 B présente la première et la dernière mesure effectuée. Ces conditions d'acquisition sont nettement moins invasives. Elles résultent tout d'abord en un photoblanchiment total de 20%. Cependant, aucune variation significative du temps de vie, mesuré à 2.5ns en début et fin d'expérience, ou du spectre de fluorescence n'a pu être observée. Cette dernière constitue donc un bon compromis entre nombre de photons comptés et invasivité cellulaire.



91: gauche, spectre de fluorescence. Droite, courbe de déclin de fluorescence. Mesures effectuées suivant deux conditions d'acquisitions A (120\*20s d'acquisition,  $P= 3.45 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ ). B (120\*10s d'acquisition,  $P=0.13\text{mW}/\mu\text{m}^2$ )

### Section.3 Applications des mesures de SLiM.

Avant de réaliser des expériences complètes de SLiM, nous avons voulu tester ses potentialités sur des échantillons connus. Pour ce faire, nous avons réalisé des acquisitions de SLiM sur des solutions connues de rhodamine afin de démontrer les améliorations quant à la détermination des espèces fluorescentes. Nous avons ensuite appliqué notre système aux études de FRET à la fois en mode d'imagerie de SLiM et de mesures de SLiM localisées.

#### a Quantification de deux espèces fluorescentes présentant un fort chevauchement spectral.

Il est souvent difficile de déterminer avec précision la proportion et le temps de vie de différentes espèces en solution en utilisant un modèle de déclin multi-exponentiel seul (Eq. 2). En effet, pour les nombres de photons comptés classiquement utilisés en microscopie, la variation des paramètres  $a_i$  et  $\tau_i$  n'entraînera pas de modifications significatives du  $\chi^2$  ou des résidus d'ajustement tout en gardant un  $\tau_m$  similaire. Une solution à ce problème sera de réaliser des mesures de SLiM et de chercher dans l'ensemble du spectre des canaux où le déclin est mono-exponentiel, et donc, ne comportant que de la fluorescence émise par une seule des deux espèces. Il est alors possible d'injecter ces valeurs dans le modèle d'ajustement comme un  $\tau_1$  qui sera fixé. Cette technique a été appliquée à 3 solutions aqueuses :

- rhodamine B (solution 1)
- rhodamine 6G (solution 2)
- mélange à part égale de rhodamine B et de rhodamine 6g (solution 3)

Tout d'abord, les caractéristiques physiques des deux fluorophores ont été extraites des mesures réalisées avec les solutions 1 et 2. Les résultats obtenus sont présentés table 2.

	$\tau_{ns}$	Maximum d'émission de fluorescence (nm)	Emission > 5% de l'émission totale (nm)
rhodamine B	1.6	558	534-598
rhodamine 6G	4.05	548	518-582

Table 2

Ces valeurs ont ensuite été utilisées pour prédire la contribution de chaque espèce pour les différents canaux en termes de temps de vie de fluorescence dans la solution 3. Par exemple, le canal 9 doit être composé de 92% d'un  $\tau = 1.6\text{ns}$  (rhodamine B) et de 8% d'un  $\tau = 4.05\text{ns}$  (rhodamine 6G). Fort de ces données, nous avons réalisé une étude de SLiM sans *a priori* sur la solution 3 afin de comparer les résultats obtenus aux données prédites.

Une analyse minutieuse a été réalisée sur tous les canaux comportant assez de photons pour l'analyse des données (canaux #5-12). L'étude des résidus nous indique un déclin à 2 exponentielles pour tous les canaux, sauf le canal 5 qui présente un déclin mono-exponentiel correspondant à un temps de vie de 4.05 ns. Nous avons alors utilisé cette valeur pour fixer le  $\tau_1$  de l'ajustement à deux exponentielles des autres canaux. Les résultats obtenus pour le canal #9 sont présentés table 3 (colonne *avec contrainte*). Ces résultats sont comparés à un ajustement à deux exponentielles sans contraintes (colonne *libre*) et aux données prédites (colonne *prédit*). L'ajustement sans contrainte nous donne une excellente estimation du  $\tau_m$ , par contre, les valeurs de  $a_i$  et de  $\tau_i$  sont très éloignées des valeurs prédites. En utilisant notre système pour extraire et injecter un temps de vie dans notre modèle, les proportions et temps de vie présentes sont estimées avec une très bonne précision.

	Avec contrainte	libre	Prédit
a1 (%)	91.5	53	92
t1 (ns)	1.65	1.79	1.60
a2 (%)	8.5	47	8
t2 (ns)	4.05	1.80	4.05
tm (ns)	1.86	1.80	1.8
$\chi^2$	2.03	2.23	NA

Table 3

## b Imagerie de temps de vie et de spectre de fluorescence en cellule vivante.

L'objectif principal de notre développement est l'étude des interactions en cellules vivantes. Nous avons donc testé notre système sur des cellules CHO exprimant une protéine CFP liée à la YFP par 15 acides aminés et constituant un excellent témoin positif de FRET. La figure 92 présente une image de SLiM acquise sur une de ces cellules.

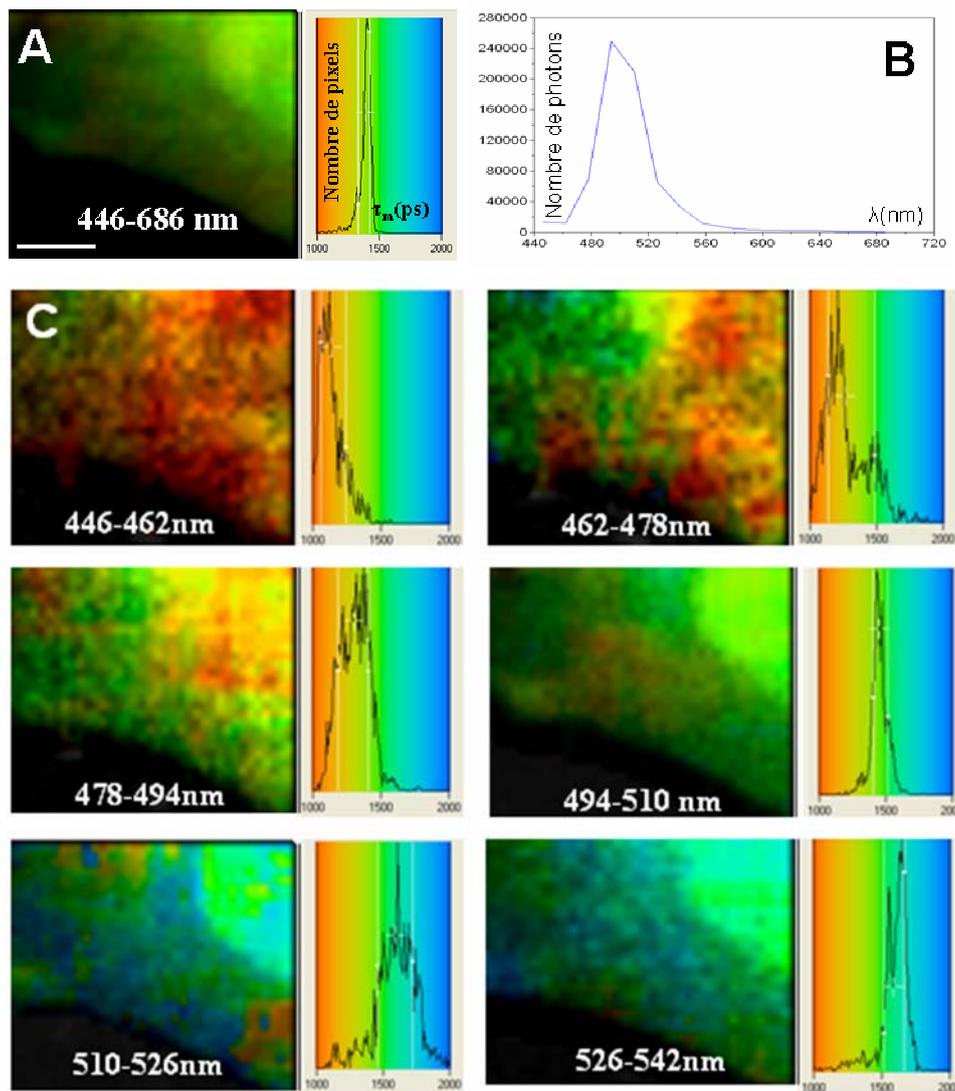


Figure 92 : Imagerie de SLiM d'un témoin positif de FRET (échelle  $5\mu\text{m}$ ).

**A** : Image de temps de vie de fluorescence d'une cellule CHO exprimant la protéine CFP-YFP (gauche), histogramme des  $\tau_m$  (droite) entre 1000 ps (rouge) et 2000 ps (bleu). La fluorescence est mesurée sur la totalité du spectre.

**B** : Spectre de fluorescence de la même cellule

**C** : Même représentation que pour A pour différents canaux spectraux

La figure 92 A correspond à l'image de temps de vie entre 446 et 686 nm et révèle un temps de vie moyen de l'ordre de 1,4 ns et la figure 92 B représente le spectre de fluorescence de cette cellule. La figure 92 C représente quant à elle les images de temps de vie (et histogrammes associés) pour 6 canaux spectraux : 446-462 nm, 462-478nm, 478-494nm, 494-510 nm, 510-526 nm, 526-542 nm. Cette mesure permet d'obtenir des informations précises sur les propriétés photophysiques de nos fluorophores. Le premier canal correspond à l'émission de la CFP seule. Ce canal présente un temps de vie très court (1,1ns) associé à un nombre de photons très faible et donc un mauvais rapport signal sur bruit. Dans les canaux suivants, le temps de vie et le nombre de photons augmentent. Ces deux résultats sont la conséquence directe du FRET. En effet, le transfert d'énergie entre la CFP et la YFP entraîne une diminution du temps de vie de la CFP ainsi qu'une émission de fluorescence de la YFP et donc, un décalage global du spectre de fluorescence. La valeur de temps de vie croissante observée résulte donc d'une proportion de plus en plus grande de photons émis par la YFP, fluorophore dont le temps de vie n'est pas réduit par le FRET.

Il est également important de préciser que l'excitation de notre échantillon a été réalisée à 830 nm. Dans nos conditions de transfection, de puissance laser et de temps d'acquisition, l'émission de la YFP est indétectable. Le décalage spectral observé est donc bien dû à un phénomène de FRET et non à une excitation parasite de la YFP.

Cette technique d'imagerie permet donc de mesurer de façon corrélée deux propriétés modifiées lors d'évènements de FRET, à savoir le temps de vie et le spectre de fluorescence. Elle permet donc une investigation poussée de ces phénomènes. Cependant, ce type d'acquisition est long (10mn pour l'image que nous venons d'étudier) et exclut toute étude dynamique. De plus, ce long temps d'acquisition peut entraîner des problèmes de photoblanchiment du fluorophore et de photodommages de la cellule étudiée (chapitre III.2.e).

### **c Mesures de SLiM localisées dans la cellule vivante.**

Pour réaliser des acquisitions plus rapides, nous avons utilisé les capacités du logiciel *Archimedes*. Ce dernier nous permet d'alterner imagerie à 2 Photons et mesures localisées de SLiM. Une acquisition, composée d'une image 2 Photons et d'une mesure de SLiM en un point nécessite entre 10 et 30 secondes. Dans ces conditions d'acquisition, l'information spatiale de la mesure est conservée ainsi que la résolution spectrale. De plus, les conditions de mesure du temps de vie sont optimales, avec une résolution temporelle de  $1,22 \cdot 10^{-11}$  s/ canal temporel et un nombre total de photons de  $1-5 \cdot 10^3$ .

Ce mode d'acquisition a été appliqué à 4 échantillons biologiques :

- Cellules HeLa exprimant la CéruleanFP seule, témoin négatif de FRET.
- Cellule HeLa exprimant la protéine CFP-YFP précédemment décrite.
- Cellule HeLa exprimant la protéine Rab6A fusionnée à la CFP. Cette protéine, petite GTPase de la superfamille des Ras, est connue pour réguler le trafic membranaire.
- Cellule HeLa exprimant Rab6A-CFP et AA2, un anticorps recombinant spécifique de la forme GTP de rab6A, marqué avec la YFP. Ces deux protéines supposées interagir servent de contrôle positif pour confirmer notre capacité à mesurer du FRET dans des conditions biologiques réelles.

La figure 93 B présente les mesures de SLiM effectuées sur les points indiqués en rouge sur les images 2-Photons présentées figure 93 A

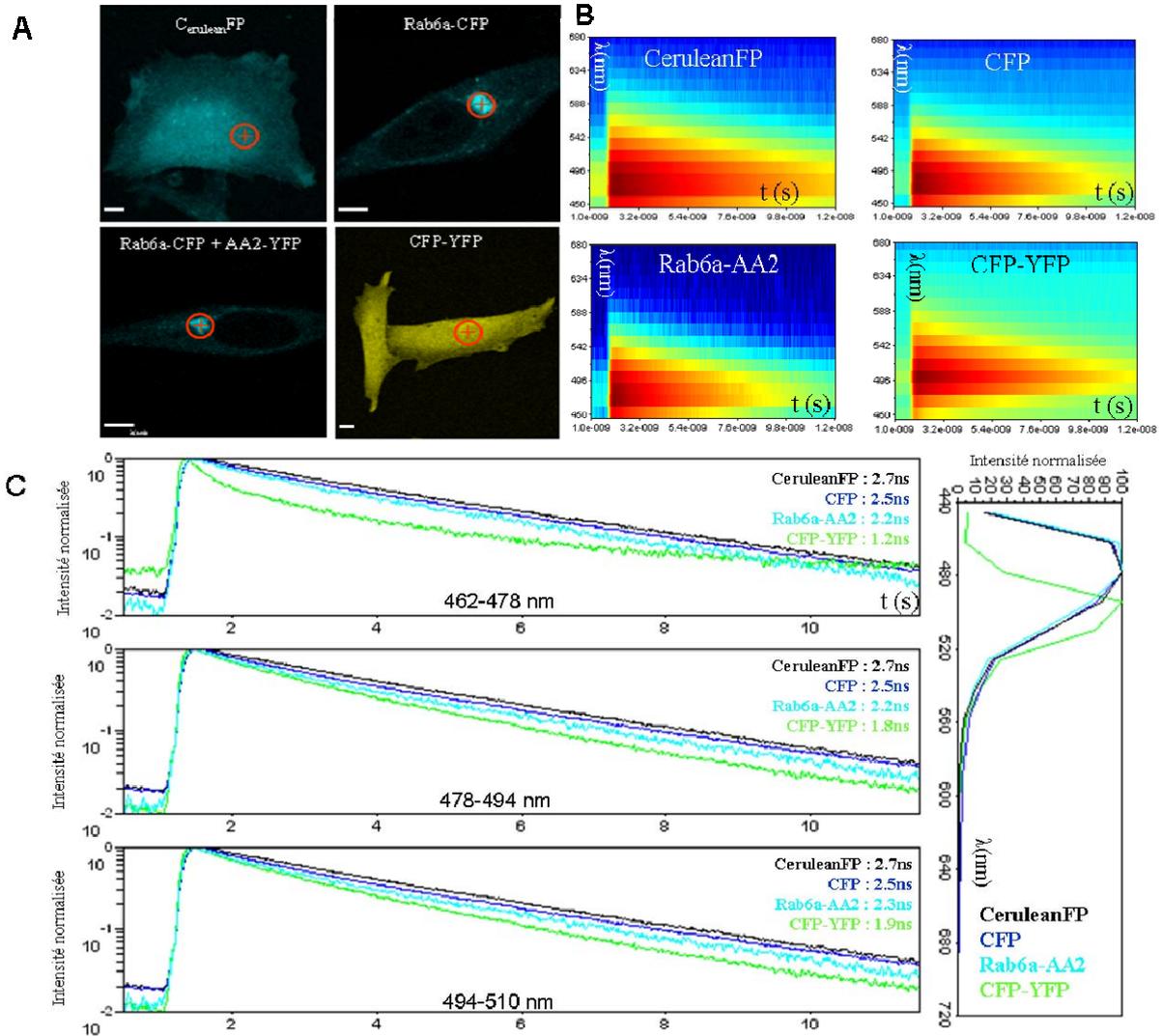


Figure 93: acquisition de SLiM en cellule vivante

A : Images deux photons (échelle  $5\mu\text{m}$ )

B : Acquisition de SLiM des quatre régions marquées en rouge en A avec  $t$  (s) le temps,  $\lambda$  (nm) la longueur d'onde et le nombre de photons dans chaque canal normalisé entre 0 (bleu) et 100 (rouge).

C : Comparaison des spectres d'émissions normalisées des échantillons présentés en A (à droite). Courbes de déclin de fluorescence ( $t$  en ns) normalisées des mêmes échantillons acquis sur trois canaux spectraux : 462-478nm; 478-494nm; 494-510nm (à gauche)

Sur cette série d'expériences, le nombre de photons est un peu faible pour réaliser une analyse de temps de vie précise sur le canal 446-462nm. Le meilleur canal pour étudier le temps de vie de la CFP est le canal 462-478nm. Les canaux suivants, 478-494nm et 494-510nm présentent les mêmes temps de vie pour la CéruleanFP et Rab6-CFP. Cette valeur augmente pour la CFP-YFP et, dans une bien moindre mesure pour le couple Rab6A-CFP/AA2-YFP (figure 93.C). Une fois encore, la variation du temps de vie le long de l'axe des  $\lambda$  est due au transfert d'énergie vers la YFP et à sa contribution au temps de vie total. Ce type d'acquisition offre le même type d'information que l'imagerie de SLiM mais requiert un temps d'acquisition beaucoup plus court. Cette technique est donc plus adaptée à l'étude dynamique de FRET par SLiM.

## Section.4 Optimisation de l'analyse et application à l'étude du récepteur GABA<sub>B</sub>

### a Optimisation de l'analyse des données de SLiM

Comme nous l'avons discuté au chapitre I.2.c, l'autofluorescence est un problème couramment rencontré lors d'acquisition d'imagerie de FLiM. Nous y avons été confrontés lors des premières étapes de mesures de temps de vie du récepteur GABA<sub>B</sub>. La figure suivante présente différents exemples d'acquisitions réalisées sur les neurones exprimant différentes protéines d'intérêt. En particulier, les mesures de temps de vie réalisées sur différentes cellules n'exprimant que GABA<sub>B1</sub>-eGFP fournissent des valeurs pouvant aller de 2,1 ns à 1,7 ns. La mesure d'un temps de vie de 1,7 ns ne signifie donc pas nécessairement l'occurrence d'un événement de FRET dans les cellules co-exprimant GABA<sub>B1</sub>-GFP et GABA<sub>B2</sub>- *t-dimer* DsRed. La figure suivante présente différents exemples d'acquisitions réalisées sur les neurones exprimant différentes protéines d'intérêt ainsi que les interprétations possibles en fonction des temps de vie mesurés.

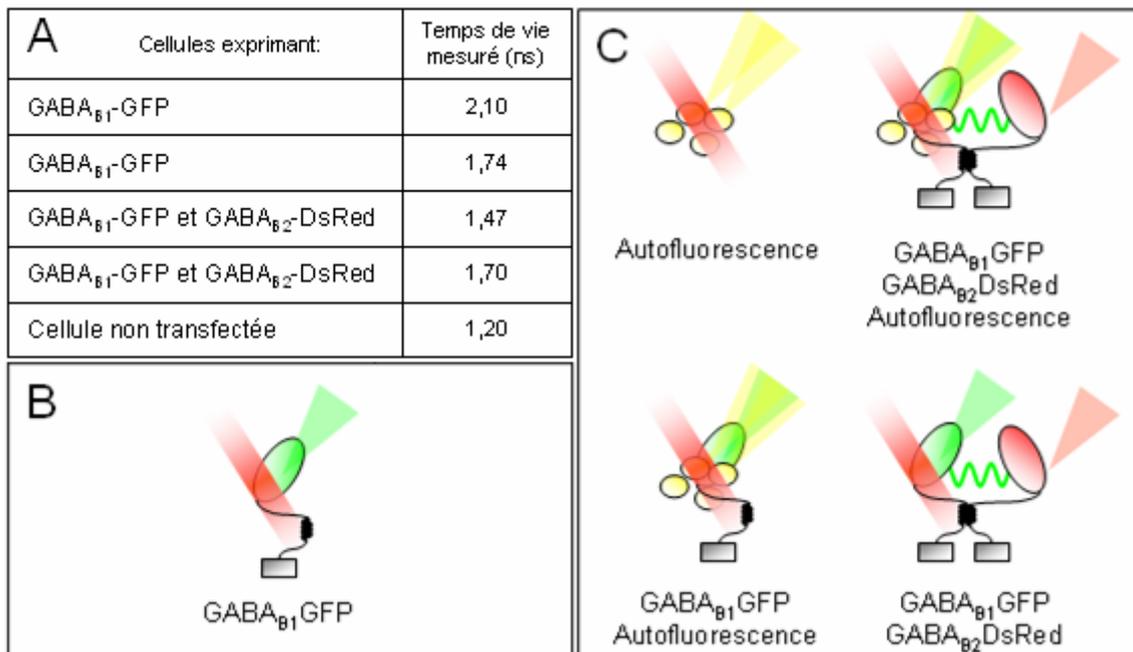


Figure 94 : mesures préliminaires réalisées lors de l'étude du récepteur GABA<sub>B</sub>.

A : valeurs de temps de vie sur différentes cellules en nanosecondes.

B : interprétation possible de la plus haute valeur de temps de vie.

C : interprétations possibles d'une diminution de temps de vie.

Comme nous l'avons discuté chapitre I.2.c, le FRET modifie à la fois le temps de vie du donneur et le spectre d'émission global (Eq. 5). Notre système d'acquisition permettant l'acquisition corrélée de ces deux informations, nous pouvons l'utiliser pour vérifier la correspondance entre ces deux modes de détermination de l'efficacité de FRET sur notre exemple précédent.

Lors d'un événement de FRET, l'énergie dont dispose initialement le donneur pour l'émission de photon est divisée en deux fractions:

- $E$  (%) seront transférés du donneur vers l'accepteur et pourront alors être convertis en photons. ( $F_{D \rightarrow A}$ )
- $1-E$  (%) pourront être émis par le donneur sous forme de photons. ( $F_D$ )

Sachant que le rendement quantique d'un fluorophore est le même que le transfert soit radiatif ou non, on peut en déduire :

$$F_{D \rightarrow A} = F_A \times Q_A \quad \text{Eq. 14}$$

Avec  $F_A$  la fluorescence émise par l'accepteur et  $Q_A$  son rendement quantique.

Lors de nos acquisitions réalisées sur le couple GABA<sub>B1</sub>-eGFP/GABA<sub>B2</sub>-*t-dimer* DsRed, la puissance d'excitation du laser et le niveau d'expression de la DsRed ne permettent pas une observation directe de GABA<sub>B2</sub>-*t-dimer* DsRed par excitation bi-photonique à 880nm. L'émission de fluorescence dans le rouge résulte donc d'un événement de FRET. La fluorescence totale est composée d'une partie provenant de l'eGFP par excitation directe et d'une autre partie provenant de la *t-dimer* DsRed après transfert d'énergie entre ces deux fluorophores

L'ensemble de la fluorescence émise par le donneur et l'accepteur peut alors être calculé de la façon suivante :

$$F = (1 - E) \times Q_D \times F_D + E \times Q_A \times F_A \quad \text{Eq. 15}$$

Avec respectivement  $F_D$  et  $F_A$  les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur et  $F$  la fluorescence totale émise.

En effectuant indépendamment la mesure des spectres d'émission de ces deux fluorophores, il nous sera possible de calculer le spectre d'émission global de notre système au regard de la diminution de temps de vie de fluorescence du donneur, cette dernière nous donnant accès à  $E$ , le dernier paramètre manquant de cette équation.

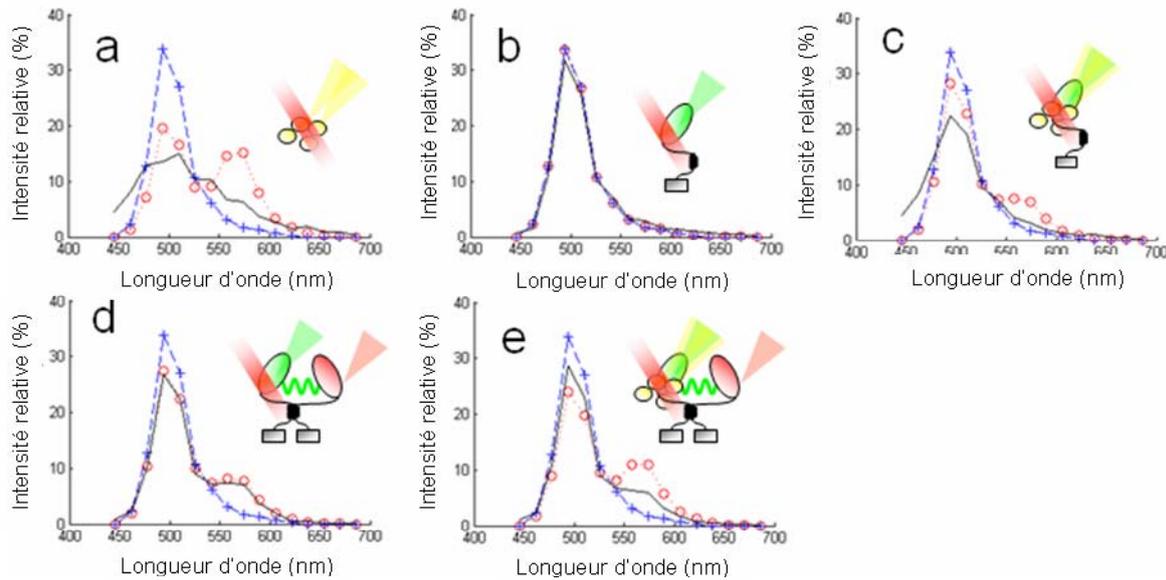


Figure 95 : spectre de fluorescence de la GFP seule (bleu) de l'échantillon mesuré (noir) et du spectre calculé (rouge) en utilisant l'équation 15. Ces analyses ont été effectuées sur les mêmes échantillons que ceux présentés figure 94.

a, cellule non transfectée. Le faible temps de vie et le spectre de fluorescence large sont caractéristiques de l'auto fluorescence cellulaire.

b, neurone exprimant  $GABA_{B1}$ -GFP. L'absence d'auto fluorescence est confirmée par la correspondance du spectre mesuré avec celui du donneur.

c, neurone exprimant  $GABA_{B1}$ -GFP. La présence d'auto fluorescence entraîne une forte différence entre les spectres mesurés et calculés

d, neurone exprimant  $GABA_{B1}$ -GFP et  $GABA_{B2}$ - t-dimer DsRed. Dans ce cas, la diminution de temps de vie est entièrement liée à l'évènement de FRET.

e, neurone exprimant  $GABA_{B1}$ -GFP et  $GABA_{B2}$ - t-dimer DsRed. Dans ce cas, nous sommes en présence à la fois de FRET et d'auto fluorescence. En effet, une deuxième bosse est visible dans la zone d'émission de la DsRed, mais dans une moindre mesure que le suggéraient les mesures de temps de vie.

Cette technique présente l'avantage de pouvoir être utilisée pour analyser des acquisitions séquentielles de spectres et de temps de vie de fluorescence. Elle nécessite cependant différents calculs, un spectre précis des fluorophores présents et une absence totale d'excitation parasite de l'accepteur.

Les acquisitions corrélées de SLiM permettent d'atteindre un niveau de confiance supérieure, tout en étant moins strictes quant aux conditions d'acquisition. En effet, lors de mesures de temps de vie, le  $\tau_m$  pour chaque canal peut être défini de la façon suivante :

$$\tau_{\lambda m} = \left[ \frac{a_{\lambda, \text{auto}} \cdot \tau_{\text{auto}} + a_{\lambda, D} \cdot \tau_D + a_{\lambda, DA} \cdot \tau_{DA} + a_{\lambda, A} \cdot \tau_A + a_{\lambda, AD} \cdot \tau_{AD}}{\sum a_{\lambda}} \right]_{\lambda=1}^{\lambda=n} \quad \text{Eq. 16}$$

Avec  $\tau_m$ , le temps de vie moyen,  $\lambda$  le canal spectral,  $a$  la proportion et  $\tau$  le temps de vie de chaque espèce avec: **auto**, autofluorescence, **D** le donneur seul, **DA** le donneur en interaction avec l'accepteur, **A** l'accepteur seul, **AD** l'accepteur en présence de donneur.

Il est important de noter que le temps de vie de fluorescence d'un fluorophore peut être considéré comme indépendant du canal spectral d'observation. La différence de temps de vie entre chaque canal spectral sera donc due à la contribution relative de chaque espèce. Sachant cela, différentes simplifications de l'équation 16 peuvent être faites. Tout d'abord, lorsque les puissances et longueurs d'onde utilisées n'entraînent pas d'excitation directe de l'accepteur, la valeur de  $a_A$  est égal à 0. Dans un cas présentant un taux d'autofluorescence nulle, l'équation devient alors :

$$\tau_{\lambda m} = \left[ \frac{a_{\lambda, D} \cdot \tau_D + a_{\lambda, DA} \cdot \tau_{DA} + a_{\lambda, AD} \cdot \tau_{AD}}{\sum a_{\lambda}} \right]_{\lambda=1}^{\lambda=n} \quad \text{Eq. 17}$$

A ce point, il est intéressant de noter que dans la zone d'émission du donneur non chevauchante avec celle de l'accepteur ( $\lambda_{D\text{min}} - \lambda_{A\text{min}}$ ), le temps de vie mesuré est indépendant de  $\lambda$ , la contribution relative de chaque espèce étant la même dans chaque canal. L'équation 17 devenant la suivante :

$$\tau_{\lambda m} = \left[ \frac{a_{\lambda, D} \cdot \tau_D + a_{\lambda, DA} \cdot \tau_{DA}}{\sum a_{\lambda}} \right]_{\lambda=\lambda D \text{ min}}^{\lambda=\lambda A \text{ min}} = \tau_m \quad \text{Eq. 18}$$

Différentes conclusions peuvent être tirées à partir de ces remarques :

- Un temps de vie constant dans  $\lambda_{D\text{min}} - \lambda_{A\text{min}}$  signifie la présence d'un seul fluorophore.

- Dans ce cas, un temps de vie plus faible que celui mesuré pour le donneur seul confirme que les espèces fluorescentes à temps de vie court correspondent exclusivement à d'autres modes de désexcitation du donneur, comme le FRET.
- Un temps de vie variable dans la zone  $\lambda_{Dmin}-\lambda_{Amin}$  correspond à la présence d'une autre espèce fluorescente. La variation du temps de vie ne peut donc pas être attribuée entièrement au FRET
- Dans le cas où l'accepteur ne subit aucune excitation directe, une augmentation du temps de vie au delà de  $\lambda_{Amin}$  pourra être attribuée à l'apparition d'une excitation indirecte de l'accepteur et confirmera d'autant plus l'interaction étudiée.

Les échantillons précédents ont été étudiés par cette méthode et permettent de déterminer sans équivoque à quel événement photophysique chaque acquisition est associée (figure 96). Toutes les acquisitions de l'étude du récepteur GABA<sub>B</sub> ont donc été analysées grâce à cette méthode.

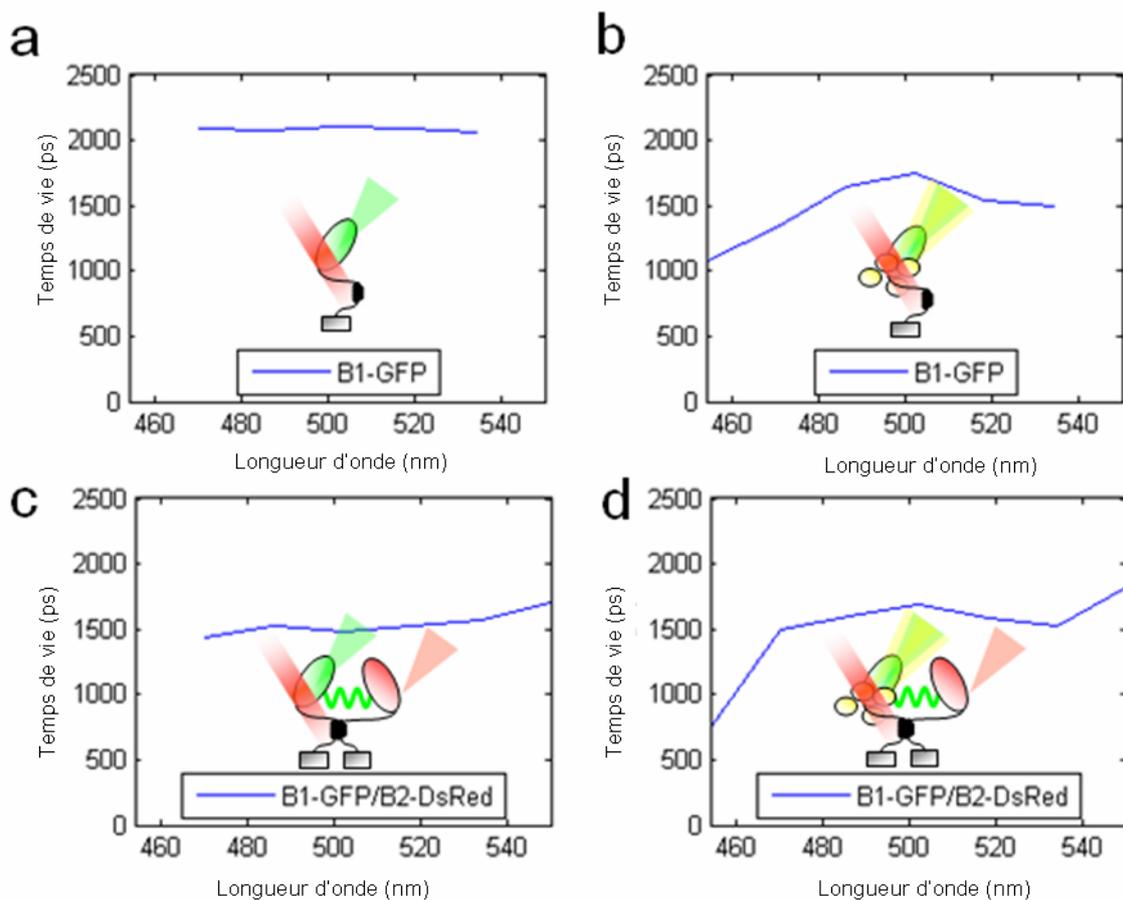
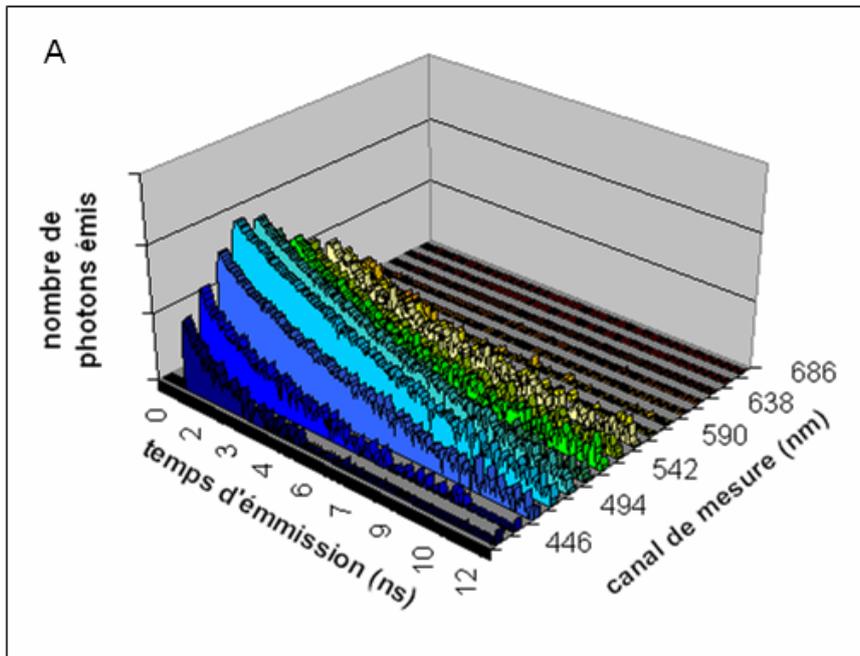


Figure 96: temps de vie de fluorescence en fonction du canal spectral mesuré. Acquisition réalisées sur des neurones exprimant GABA<sub>B1</sub>-GFP seul (a et b) ou GABA<sub>B1</sub>-GFP et GABA<sub>B2</sub>-t-dimer DsRed (c et d). La signature de SLiM permet facilement de distinguer la présence (b, d) ou l'absence (a et c) d'autofluorescence dans nos cellules en fonction de l'homogénéité des valeurs de  $\tau$  en fonction de  $\lambda$ ... Voir le texte pour plus de détails

Il est également intéressant de noter que les photons émis sur les premiers canaux de notre détecteur proviennent uniquement de l'autofluorescence cellulaire. Si le nombre de photons accumulés est suffisant, il devient possible d'extraire le temps de vie de l'autofluorescence dans ce canal. Ce dernier peut alors être utilisé comme a priori dans un modèle de décroissance tri-exponentielle qui se présente alors de la sorte.

$$\tau_{\lambda_m} = \left[ \frac{a_{\lambda_{auto}} \cdot \tau_{auto} + a_{\lambda_D} \cdot \tau_D + a_{\lambda_{DA}} \cdot \tau_{DA}}{\sum a_{\lambda}} \right]_{\lambda=\lambda D \min}^{\lambda=\lambda A \min} \quad \text{Eq. 19}$$

Il est alors possible de déterminer le temps de vie du donneur en interaction ainsi que les contributions relatives de chaque espèce. Un temps de vie moyen exempt de la contribution de l'autofluorescence peut alors être calculé pour chaque canal. Cette technique reste cependant limitée aux acquisitions comportant un grand nombre de photons par courbe et ne peut donc pas être généralisée à toutes les acquisitions. Nous avons réalisé ce type d'analyse sur différentes séries d'acquisitions entreprises sur GABA<sub>B1</sub>-GFP et GABA<sub>B2</sub>-DsRed répondant au critère statistique précédent.



97: Mesure de SLiM réalisée sur la membrane d'un neurone co-exprimant GABA<sub>B1</sub>-GFP et GABA<sub>B2</sub>. **A**, courbes de SLiM. Un temps de vie court est visible pour les canaux bleus. **B**, le temps de vie du premier canal (0.16 ns) est introduit dans un modèle d'ajustement tri-exponentiel. Le résultat de cet ajustement est présenté dans ce tableau. La colonne *tm* correspond au  $\tau_m$  du fit et la colonne *tm-auto* au  $\tau_m$  sans la contribution de l'autofluorescence. Les valeurs de *a* et *t* sont respectivement exprimées en % et en ns.

<b>B</b>	a-auto	t-auto (fixé)	a1	t1	a2	t2	tm	tm-auto
Ch. 4	21,8	<b>0.16</b>	16,3	0.66	61,9	2.10	1.44	<b>1.80</b>
Ch. 5	17,5	<b>0.16</b>	21,5	0.87	61	2.18	1.55	<b>1.80</b>
Ch. 6	26,8	<b>0.16</b>	18,4	0.80	54,8	2.15	1.36	<b>1.81</b>

L'ajustement réalisé figure 97 pour les canaux 4-6 (correspondant à un spectre d'émission compris entre 494nm et 542nm) en fixant le  $\tau$  d'une des décroissances à un  $\tau_{\text{auto}}$  déterminé par un ajustement du premier canal comporte différentes informations intéressantes. Tout d'abord, le  $t_2$  correspond parfaitement, et sans contraintes appliquées, au temps de vie du donneur seul. Les  $t_1$  sont également en accord avec ceux trouvés dans le cadre de mesures réalisées sur des neurones non autofluorescents exprimant GABA<sub>B1</sub>-GFP et GABA<sub>B2</sub>-DsRed. Enfin, l'écart type des temps de vie moyens devient beaucoup plus réduit après soustraction de la composante autofluorescente (passage de 92 à 26ps). Ces différentes remarques semblent bien confirmer la validité de cette approche et rendent exploitables des données qui n'auraient pu l'être directement en FLIM. En effet, au regard du nombre de photons, un ajustement à trois exponentielles sans contraintes devient fortement instable et donne des valeurs individuelles de  $\tau_i$  inexploitables (ces valeurs sont présentées dans la table suivante.)

	a-auto	<b>t-auto (libre)</b>	a1	t1	a2	t2	tm	<b>tm - auto</b>
Ch.4	22,8	<b>0,28</b>	57,9	1,63	19,4	3,13	1,62	<b>2,01</b>
Ch.5	30,6	<b>0,82</b>	53,2	1,92	16,2	3,43	1,83	<b>2,27</b>
Ch.6	47,5	<b>0,13</b>	37,7	1,86	14,8	4,44	1,98	<b>2,59</b>

**Table 4** : avec t en ns et a en %

## **b Application biologique : étude de l'interaction entre le récepteur GABA<sub>B</sub> et 1433ζ**

Notre méthode d'acquisition et d'analyse dédiée à l'étude fonctionnelle du récepteur GABA<sub>B</sub> dans les neurones ayant été validée, nous avons entrepris une étude plus statistique du complexe GABA<sub>B1</sub>/GABA<sub>B2</sub>/1433ζ. Pour cela, nous avons réalisé des mesures de SLiM localisées au niveau de la membrane de neurones exprimant différentes protéines. Notre stratégie d'acquisition s'est décomposée en deux temps.

Tout d'abord, nous avons voulu tester l'effet de 14-3-3ζ sur la formation du récepteur GABA<sub>B</sub>. Nous avons donc réalisé des acquisitions sur des cellules neuronales surexprimant :

- (1) GABA<sub>B1</sub>-GFP, notre référence négative d'interaction,
- (2) GABA<sub>B1</sub>-GFP /GABA<sub>B2</sub>- *t-dimer* DsRed, notre témoin positif de FRET
- (3) GABA<sub>B1</sub>-GFP /GABA<sub>B2</sub>- *t-dimer* DsRed/14-3-3ζ pour tester l'effet de 14-3-3ζ sur la formation de l'hétérodimère.

Pour confirmer un éventuel effet de 14-3-3ζ, nous avons également voulu tester une condition permettant d'éliminer entièrement l'effet de 14-3-3ζ. Nous avons pour cela traité des cellules de la condition (3) avec des *siRNA* ciblant 14-3-3ζ (4). Les *siRNA* sont des « small interference RNA » qui ont la particularité de se lier spécifiquement aux ARN codant pour la protéine ciblée, empêchant toute traduction de cette protéine.

Nous avons réalisé des acquisitions de SLiM sur ces différentes conditions et avons exclu les cellules présentant une composante autofluorescente (cf. chapitre précédent) jusqu'à obtenir au moins 30 acquisitions par condition. Pour chacune, nous avons ensuite calculé le temps de vie moyen (eq. 3) pour les canaux 4, 5 et 6 puis calculé la moyenne de ces  $\tau_m$ . L'ensemble de ces résultats est présenté figure 98.

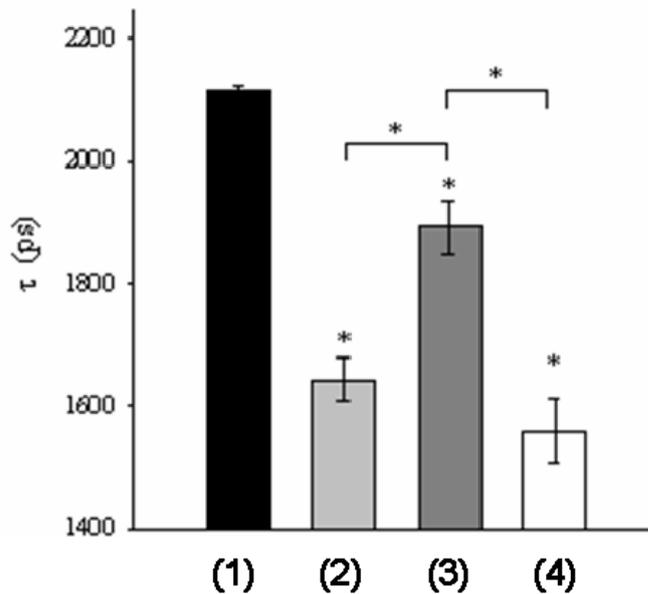


Figure 98: temps de vie moyen de la GFP extrait de mesures de SLiM réalisées sur des cellules neuronales exprimant :

(1)  $GABA_{B1}$ -GFP,

(2)  $GABA_{B1}$ -GFP / $GABA_{B2}$ - *t-dimer* DsRed,

(3)  $GABA_{B1}$ -GFP / $GABA_{B2}$ - *t-dimer* DsRed/14-3-3 $\zeta$ ,

(4)  $GABA_{B1}$ -GFP / $GABA_{B2}$ - *t-dimer* DsRed/14-3-3 $\zeta$ /siRNA anti 14-3-3  $\zeta$

~30 acquisitions par conditions

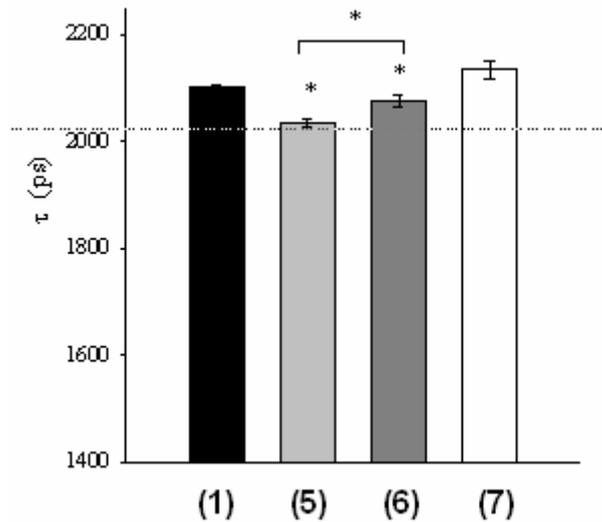
L'action de 14-3-3 $\zeta$  a donc pour effet de dissocier le complexe  $GABA_B$ . L'augmentation de temps de vie entre les conditions (2) et (3) confirme clairement une dissociation des deux sous-unités  $GABA_B$  par l'introduction de 14-3-3 $\zeta$ . L'ajout de *siRNA* dans la condition (4) permet quant à elle un retour au temps de vie et donc au niveau d'interaction de la condition (2). Ce temps de vie étant même légèrement inférieur à celui de (2), on peut supposer que l'abolition de l'expression de 14-3-3 $\zeta$  limite la dissociation de l'hétérodimère intrinsèquement due aux protéines endogènes.

Forts de ces résultats, nous avons voulu aller plus loin dans notre compréhension de ce mécanisme en testant laquelle des deux sous-unités de  $GABA_B$  subit l'effet de 14-3-3 $\zeta$ . Nous avons donc testé deux nouveaux couples de protéines :

(5)  $GABA_{B1}$ -GFP /14-3-3 $\zeta$  -*t-dimer* DsRed

(6)  $GABA_{B2}$ -GFP /14-3-3 $\zeta$  - *t-dimer* DsRed

Nous avons donc suivi la même stratégie d'acquisition que pour les conditions 1-4 et avons obtenu les résultats suivants :



99: temps de vie moyen de la GFP extrait de mesures de SLiM réalisées sur des cellules neuronales exprimant :  
(1)  $GABA_{B1}$ -GFP,  
(5)  $GABA_{B1}$ -GFP /14-3-3 $\zeta$ -t-dimer DsRed  
(6)  $GABA_{B2}$ -GFP /14-3-3 $\zeta$ -t-dimer DsRed  
(7)  $GABA_{B1}$ -ASA-GFP/14-3-3 $\zeta$ -DsRed  
~30 acquisitions par conditions

Les résultats obtenus sont nettement plus complexes à interpréter que les précédents. La diminution de temps de vie est en effet beaucoup plus faible pour le complexe  $GABA_B/14-3-3\zeta$ . Cette diminution est cependant plus importante pour l'interaction  $GABA_{B1}/14-3-3\zeta$  que pour  $GABA_{B2}/14-3-3\zeta$ . Cette deuxième interaction est donc peut-être indirecte et facultative pour la fixation de  $GABA_{B1}/14-3-3\zeta$ . Pour éclaircir cette dernière hypothèse, nous avons testé une nouvelle condition.

La protéine  $GABA_{B1}$  est normalement exportée du réticulum endoplasmique par l'intermédiaire de  $GABA_{B2}$ .  $GABA_{B1}$  est maintenue au niveau du RE par un motif de rétention appelé RSR. La mutation de ce motif, donnant la protéine  $GABA_{B1}$ -ASA, lui permet de sortir librement du RE. Une plus grande proportion de protéines  $GABA_{B1}$ -ASA sous une forme non hétéodimérique sera présente dans la cellule. Nous avons transfecté une série de neurones avec les protéines  $GABA_{B1}$ -ASA-GFP/14-3-3 $\zeta$ -DsRed (7). Puis réalisé les acquisitions et analyses précédemment décrites. L'interaction entre ces protéines est alors réduite à un niveau basal. Il semblerait donc que les deux membres du récepteur soient indispensables à la fixation de 14-3-3 $\zeta$ , cette dernière se fixant alors avec plus de proximité pour  $GABA_{B1}$  que pour  $GABA_{B2}$ .

## **IV. Synthèse, conclusions et perspectives.**

### **Section.1 Bilan général**

#### **a Le FLIM pour l'étude du FRET**

Les mesures de FRET sont une méthode de choix pour l'étude des interactions moléculaires dans la cellule. Cette mesure peut être faite de différentes façons. Cependant il apparaît, au regard de notre pratique et de la littérature, que les stratégies reposant sur les mesures de temps de vie sont les plus à même d'apporter des informations pertinentes dans le cadre des études réalisées dans un contexte cellulaire. En particulier, les techniques de TCSPC apportent un niveau de précision et de reproductibilité très élevé à nos mesures. Pour obtenir ce niveau de confiance, une étape préliminaire de caractérisation du système, à la fois biologique et instrumental, se révèle être indispensable. L'amélioration de l'instrumentation liée à cette technique permet également d'étendre de plus en plus son champ d'application tout en simplifiant le processus d'acquisition ou d'analyse. Le choix des différents modules de la chaîne de FLIM dépendra alors du type d'application envisagée.

L'utilisation d'une source laser conviviale de type Chameleon (Coherent inc.) adjointe à une carte de comptage et à un système de détection intégré, refroidi et sécurisé comme le PMC100 (B&H) fournit un système robuste et convivial permettant de réaliser la majorité des applications de FLIM. Un tel système peut alors facilement être rendu accessible à un large public sans risque pour le matériel ni pour l'expérimentateur.

Ce type d'instrumentation devra cependant être adapté dans le cas de contraintes particulières. En particulier, l'utilisation d'un détecteur de type MCP-PMT améliorera grandement le temps de réponse instrumental mais nécessite l'utilisation d'une alimentation haute tension et d'une obscurité totale lors des expériences. Ce type de modification simplifie l'analyse des données, mais exclut l'utilisation du système par un public non averti.

De même, l'utilisation de sources pulsées comme le *t-Pulse*, dont la fréquence d'excitation est inférieure aux traditionnels 76MHz permet d'étendre la fenêtre temporelle d'observation et facilite une fois encore l'analyse des courbes de déclin de fluorescence. Utilisé seul, le *t-Pulse* limitera cependant le choix des fluorophores observés, l'excitation étant alors obtenue à 1030nm. Le couplage à une fibre permettant la génération d'un continuum de lumière étendra sa gamme d'utilisation tout en rendant le système plus difficile à manipuler.

Le choix de l'instrumentation sera également dicté par le type de mesures envisagé. En particulier, l'utilisation des Qdots étant actuellement en plein essor, les systèmes de mesures de temps de vie doivent s'y adapter. L'adjonction d'un système réduisant fortement la cadence d'excitation, comme les *cavity dumper* ou les sélecteurs d'impulsions, est indispensable.

Le système de mesures de temps de vie implémenté dans notre laboratoire a été optimisé pour obtenir une bonne précision en cellule vivante. L'utilisation d'un MCP-PMT et d'une source laser adaptée à l'échantillon nous offre des conditions d'acquisition optimales. La caractérisation rigoureuse que nous avons menée nous a permis de déterminer les conditions d'acquisition adéquates et confirme la robustesse et la reproductibilité de nos mesures. Enfin, des modes d'analyse dédiés, à la fois des courbes de déclin de fluorescence et des images de temps de vie, nous permettront de tirer parti au mieux des mesures effectuées. Ce système subit cependant les limites d'utilisation de la technique de FLIM par TCSPC appliquée à l'étude du vivant en microscopie. Le nombre de photons requis pour ce type de mesure nécessite une irradiation lumineuse pouvant induire un photoblanchiment ou une photoconversion du fluorophore et altérer son temps de vie. De plus, la complexité de l'environnement cellulaire, en particulier la présence d'autofluorescence ou la présence de microenvironnements variables, rend difficile l'interprétation des temps de vie mesurés. Pour aller plus loin dans la compréhension des phénomènes étudiés, une solution consiste à acquérir plus d'informations cohérentes sur nos fluorophores en augmentant le nombre d'axes de mesures.

## **b Le SLiM**

Le spectre et le temps de vie de fluorescence sont deux types de mesures permettant d'accéder à l'étude des interactions par mesure de FRET. Elles sont d'autant plus complémentaires qu'elles réagiront de façons très différentes aux divers écueils liés à ces mesures. En effet, le temps de vie de fluorescence affranchit des problèmes liés aux concentrations variables de fluorophores et des limites liées aux mesures d'intensité toutes deux rencontrées dans les études spectrales. L'étude du spectre nous donne cependant une information plus fiable qu'une simple acquisition centrée autour d'une longueur d'onde définie. Elle présentera une réponse très différente du FRET à la présence d'autofluorescence cellulaire. La combinaison de ces deux techniques élargit également la gamme de marquage réalisable de façon simultanée dans une même cellule. L'utilisation de fluorophores

à temps de vie classiques, comme les XFP adjoints à une gamme de quantum dots permet de doubler le nombre de marquages simultanés. Ce type d'approche nécessite cependant l'utilisation de méthodes d'analyse adaptées. En particulier l'extraction des proportions de temps de vie courts et longs nous permet d'obtenir deux spectres correspondant l'un au mélange de XFP et l'autre au Qdots. Il est alors possible d'utiliser un algorithme de décomposition spectrale pour déterminer les contributions relatives des différentes espèces en présence. Les acquisitions de SLiM semblent donc présenter de nombreuses potentialités aussi bien pour les études de FRET que pour des approches visant à déterminer avec précision les propriétés photophysiques d'un ensemble de fluorophores.

### **c Limitations actuelles**

Les mesures de temps de vie basées sur le TCSPC offrent des résultats précis et reproductibles. Elles présentent cependant deux inconvénients majeurs : le nombre de photons nécessaires à une bonne interprétation et la compréhension de machineries protéiques impliquées dans les processus physiologiques.

Le grand nombre de photons requis induit des temps d'acquisitions de plusieurs minutes pour réaliser une image de temps de vie. Il devient alors impossible de réaliser des études de la dynamique des interactions moléculaires en mode image. La seule solution actuellement réalisable consiste à choisir une zone d'étude et à réaliser des mesures ponctuelles et localisées. Le temps d'acquisition peut alors atteindre 500ms en utilisant des cellules présentant un taux de marquage élevé. Ces conditions s'éloignent cependant des conditions physiologiques d'expression des protéines. De plus, le fait de positionner le laser en un même point induit un stress local très fort et ne pourra donc pas être prolongé au risque de voir à la fois une dégradation des fluorophores utilisés et une apparition d'autofluorescence cellulaire.

Nous avons en particulier rencontré ce problème de sensibilité lors d'études d'interactions entre Ac1p et Rsc2p chez *Saccharomyces*. Dans ce cas, la photosensibilité de l'échantillon a limité nos conditions d'acquisition à une illumination de faible puissance de l'ensemble du champ d'observation accumulé pendant 1 à 3 secondes pour constituer une courbe de déclin de fluorescence. Ce type d'échantillon ne permet donc pas de réaliser d'imagerie de temps de vie et exclut toute information relative à la localisation de ces interactions.

Les mesures de FRET permettent d'accéder uniquement à un nombre limité d'interactions simultanées. La technique classiquement usitée permet d'observer deux éléments d'un même complexe. Ce nombre peut être augmenté en réalisant des triples marquages, la deuxième molécule étant à la fois accepteur de la première et donneuse pour la deuxième. Une autre solution utilisant une BiFC comme donneur pourrait également être envisagé pour augmenter ce nombre. Elle reste cependant limitée et l'étude de grande machinerie nécessitera une suite d'expériences séquentielles. Il est alors impossible de différencier un ensemble de molécules formant un complexe ou se liant de façon transitoire et séquentielle deux à deux par des études de FRET seules.

## **Section.2 Perspectives**

### **a Etude dynamique des interactions**

*Les modes de régulation des activités cellulaires passent par des machineries moléculaires complexes intégrant de nombreux partenaires. Ces derniers peuvent interagir de façon simultanée ou séquentielle suite à un stimulus et induire des phénomènes biologiques différents. L'étude dynamique de ces interactions est donc fondamentale pour la compréhension du fonctionnement global de ces complexes. Deux grands types de solutions peuvent être envisagés pour réaliser ce type d'étude. La première nécessite une adaptation instrumentale à cette problématique alors que la deuxième consistera à trouver une solution analytique permettant de travailler avec un nombre de photons réduit tout en conservant la qualité de détermination du temps de vie de fluorescence.*

#### ***i) Solutions instrumentales.***

Comme nous l'avons vu précédemment (chap. I.2.c), différentes techniques permettent de réaliser des mesures de temps de vie rapides. En particulier, les systèmes de mesures de temps de vie utilisant des caméras à portes temporelles permettent de réaliser une image de temps de vie complète en quelques secondes. Cette vitesse s'obtient cependant au détriment de la précision des mesures.

Une solution intermédiaire entre la vitesse d'un système à portes temporelles et la précision d'un système TCSPC peut cependant être envisagée. Une série de mesures de temps de vie en TCSPC acquises avec un grand nombre de photons nous permet de déterminer avec précision les temps de vie des espèces fluorescentes en présence. Les temps de vie obtenus pour les différentes espèces peuvent être introduits dans les modèles d'ajustement des déclin obtenus sur les systèmes à portes temporelles. Ce type d'approche permettra d'améliorer le paramétrage du système ainsi que la fiabilité des mesures de temps de vie sans pour autant réduire la vitesse d'acquisition du système ou introduire des *a priori* théoriques dans le modèle d'ajustement.

#### ***ii) Solutions analytiques.***

La solution la plus couramment utilisée pour améliorer les statistiques de photons des courbes de déclin est donc de sacrifier une partie de l'information spatiale en regroupant les pixels par groupes. Nous envisageons actuellement, avec Dave Trinel et en collaboration avec

Yves Usson, une autre solution pour palier à ce manque de photons utilisant une méthode d'inférence statistique, le *bootstrap*, qui va permettre de générer des photons artificiellement en nous basant sur l'échantillon initial.

Le mot *bootstrap* provient de l'expression anglaise « to pull oneself up by one's bootstrap » (se soulever en tirant sur les languettes de ces bottes) équivalent de notre expression « à la force du poignet » (86). Le principe de cette méthode est de ré-échantillonner un grand nombre de fois l'échantillon initial. Il est alors possible d'estimer l'erreur type de la médiane de l'échantillon initial en observant la variabilité des médianes des échantillons de *bootstrap* (87). Nous espérons pouvoir détourner la fonction première du *bootstrap* pour générer un échantillon virtuellement plus grand en termes de photons en introduisant une dispersion temporelle suivant une loi gaussienne (noyau de Parzen). De cette manière, nous espérons pouvoir réaliser des ajustements sur des courbes de décroissance comportant un nombre de photons théoriquement trop faible pour ce type d'analyse.

## **b Compréhension des machineries moléculaires complexes.**

Les études de temps de vie permettent d'atteindre une meilleure compréhension des interactions moléculaires, que ce soit sur des échantillons fixés ou vivants. Cependant, la détection d'interaction par mesures de FRET peut avoir différentes significations biologiquement très différentes. En particulier, la compréhension des complexes multi protéiques ne peut être obtenue par les mesures de FRET seules, ces dernières étant limitées à deux voire trois partenaires. La FCS apporte des informations sur la vitesse de diffusion de nos protéines. La combinaison de ces informations de diffusion permet de déterminer si deux protéines sont libres, incluses dans un complexe multi protéiques ou fixées à des éléments structuraux de la cellule comme la chromatine. Couplés aux études de FRET, les études de FCS permettent d'atteindre une bien meilleure compréhension des mécanismes biologiques à l'œuvre. La FCCS (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy) quant à elle, permet de savoir si deux protéines sont membres d'un même complexe. Cette technique offre donc un outil parfaitement complémentaire des informations fournies par les mesures de FRET.

En couplant ces trois techniques, il sera possible d'obtenir une signature physique de l'assemblage étudié. L'ensemble de ces signatures est décrit dans le schéma suivant. La prochaine étape de notre travail comprend donc ce couplage. Dans un premier temps, le laboratoire s'est équipé de la solution de FCS proposée par la société Leica, le système *ISS Vista FCS*. Ce système est composé de deux diodes à avalanche et d'une carte de comptage. Un système de couplage par fibre optique est installé en position descannée du confocal et permet de conduire le signal aux photodiodes. Ce système comporte également un filtre permettant de bloquer les réflexions infrarouges et un ensemble de filtres permettant de mesurer la fluorescence dans une gamme de longueur d'onde spécifique. Par cette approche, il est possible de réaliser séquentiellement les acquisitions de FLIM et de FCS en utilisant une instrumentation optimisée pour chacune de ces techniques.

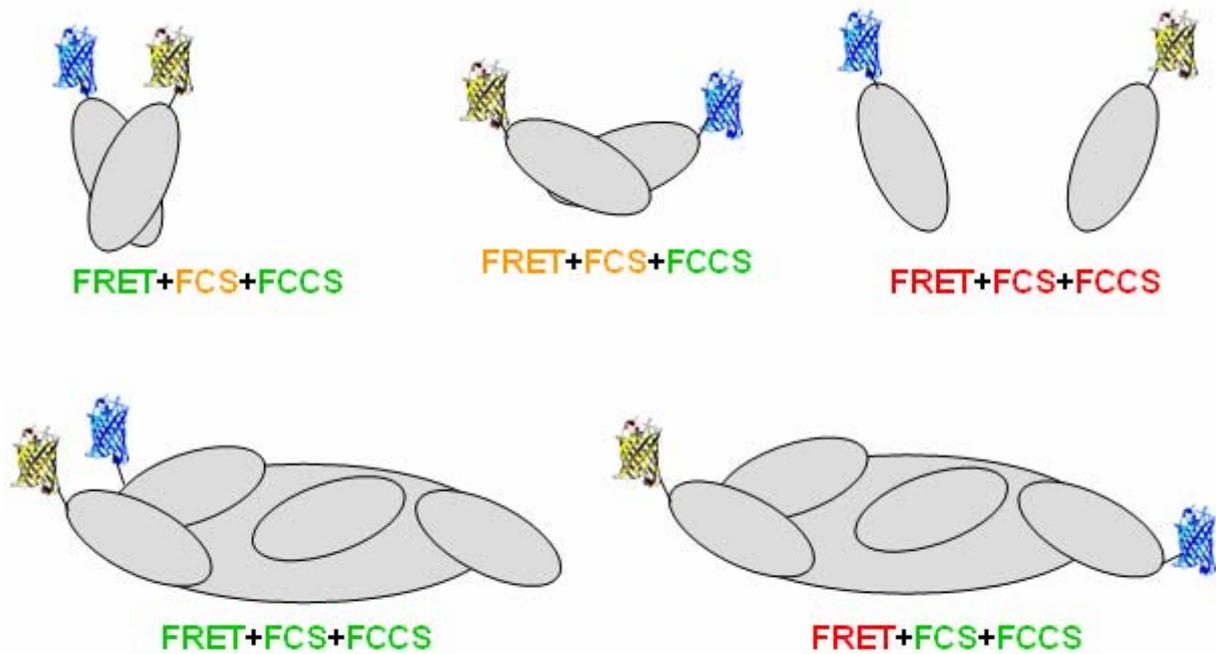


Figure 100: schéma représentatif des différents types d'interactions moléculaires avec :

- En gris : les protéines présentes.
- En bleu et jaune : les deux marqueurs utilisés
- Sous chaque cas, les couleurs vertes, jaunes et rouges représentent respectivement une réponse forte, faible et nulle obtenue :

- Par FRET (diminution du temps de vie)
- Par FCS (diminution de la constante de diffusion)
- Par FCCS (niveau de cross corrélation entre les deux molécules étudiées).

Cette approche ne permet cependant pas d'obtenir ces différentes informations sur les mêmes photons. L'acquisition simultanée de ces informations présente des contraintes instrumentales assez particulières de par les exigences respectives des deux techniques :

- La FCS nécessite une concentration locale faible alors que le FLIM requiert un nombre de photons important pour être analysée de façon optimale. Le détecteur doit donc présenter un rendement quantique élevé tout en conservant une réponse instrumentale suffisamment rapide pour les mesures de FLIM. Parmi les solutions de détection récentes, le MCP-PMT R3809U-64 semble un excellent compromis, de par sa FWHM de 75ps pour un rendement de 38%.
- Le mode de comptage des photons est très différent dans les deux cas et les cartes dont nous disposons actuellement ne permettent pas ces deux types de mesures. Certaines cartes de comptage, comme la SPC-830 (Becker&Hickl), permettent

cependant d'acquérir à la fois le temps depuis le début de l'acquisition conjointement au temps depuis la dernière impulsion. La combinaison de ces deux techniques nécessitera donc une telle carte.

### **c Complexité et modélisation**

Comme nous venons de le discuter, la compréhension des dynamiques d'interactions des complexes multi-protéiques nécessitent le couplage de différentes techniques d'étude. Ce type d'acquisitions multiples génère des jeux de données d'une grande complexité nécessitant des modes d'analyse dédiés. Une illustration de cette complexité nous est fournie par l'imagerie de SLiM (figure 92). Ces dernières obligent à travailler dans un premier temps dans un espace à 4 dimensions ( $x, y, \lambda, \tau$ ). Après analyse des courbes de décroissance, le nombre de dimensions analysables devient rapidement très conséquent ( $x, y, \lambda, a_1, \tau_1, a_2, \tau_2$ ). Une fois ces techniques couplées à de nouvelles approches comme la FCS/FCCS, il devient crucial d'utiliser des modes d'études adaptés pour comparer et classifier les échantillons observés. Les techniques d'analyses statistiques comme l'analyse en composante principale (ACP) paraissent particulièrement adaptées à ce genre de problématiques, ces dernières permettant de réduire à 2 ou 3 le nombre de dimensions tout en conservant la majorité de l'information initiale et son caractère discriminant. Des méthodes de classification hiérarchiques permettent alors facilement de classifier nos observations en grandes familles présentant des caractéristiques communes.

Au-delà de la comparaison des échantillons étudiés, une autre étape semble indispensable à une exploitation totale des résultats obtenus. La création de modèles mathématiques permettant de décrire et de simuler les évènements observés permet en particulier de tester les différentes hypothèses émises en fonction des connaissances initiales et de valider ou non ces dernières. Ce type d'approche nous permet également de déterminer les informations manquantes et d'affiner les expériences qui devront être entreprises que se soit en testant des candidats pouvant potentiellement intervenir dans les mêmes réseaux fonctionnels ou en définissant de nouvelles dimensions à étudier pour confirmer une théorie de façon fiable et définitive. L'avenir de l'étude de la dynamique des interactions moléculaires nécessite donc à la fois un dialogue et une adaptabilité entre de nombreuses disciplines.



## Références bibliographiques :

1. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003;421(6921):448-53.
2. Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 2003;21(11):1369-77.
3. Spector D. Nuclear domains. *Journal of cell sciences* 2001;114:2891-2893.
4. Tsien RY. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochemistry* 1998;67:509-544.
5. Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996;273(5280):1392-5.
6. GHR. handbook, help me understand genetics. *medecine Unlo*, editor; 2006.
7. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004;22(12):1567-72.
8. probes m. *The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. probes m, editor: molecular probes; 2006.
9. Dundr M, Misteli T. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 2001;356(Pt 2):297-310.
10. Strouboulis J, Wolffe AP. Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 1996;109 ( Pt 8):1991-2000.
11. Gonzalez-Melendi P, Beven A, Boudonck K, Abranches R, Wells B, Dolan L, Shaw P. The nucleus: a highly organized but dynamic structure. *J Microsc* 2000;198(Pt 3):199-207.
12. Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. *Science* 1998;280(5363):547-53.
13. Isogai Y, Tjian R. Targeting genes and transcription factors to segregated nuclear compartments. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(3):296-303.
14. Mahy NL, Perry PE, Gilchrist S, Baldock RA, Bickmore WA. Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol* 2002;157(4):579-89.
15. Mironov AA, Polishchuk RS, Luini A. Visualizing membrane traffic in vivo by combined video fluorescence and 3D electron microscopy. *Trends Cell Biol* 2000;10(8):349-53.
16. Rizzuto R, Carrington W, Tuft RA. Digital imaging microscopy of living cells. *Trends Cell Biol* 1998;8(7):288-92.
17. Gurskaya NG, Fradkov AF, Terskikh A, Matz MV, Labas YA, Martynov VI, Yanushevich YG, Lukyanov KA, Lukyanov SA. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Lett* 2001;507(1):16-20.
18. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974;184(139):868-71.
19. Kornberg RD, Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 1974;184(139):865-8.
20. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389(6648):251-60.
21. Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 2002;319(5):1097-113.

22. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2001;2(4):292-301.
23. Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(8):605-12.
24. Spector DL. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* 2003;72:573-608.
25. Taroni P, Valentini G, Comelli D, D'Andrea C, Cubeddu R, Hu DN, Roberts JE. Time-resolved microspectrofluorimetry and fluorescence lifetime imaging of hypericin in human retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 2005;81(3):524-8.
26. Tini M, Benecke A, Um SJ, Torchia J, Evans RM, Chambon P. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol Cell* 2002;9(2):265-77.
27. Lucey MJ, Chen D, Lopez-Garcia J, Hart SM, Phoenix F, Al-Jehani R, Alao JP, White R, Kindle KB, Losson R and others. T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase (TDG) as a coregulator of transcription interacts with SRC1 family members through a novel tyrosine repeat motif. *Nucleic Acids Res* 2005;33(19):6393-404.
28. Chen D, Lucey MJ, Phoenix F, Lopez-Garcia J, Hart SM, Losson R, Buluwela L, Coombes RC, Chambon P, Schar P and others. T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase potentiates transcription of estrogen-regulated genes through direct interaction with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 2003;278(40):38586-92.
29. Um S, Harbers M, Benecke A, Pierrat B, Losson R, Chambon P. Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 1998;273(33):20728-36.
30. Takahashi H, Hatakeyama S, Saitoh H, Nakayama KI. Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein. *J Biol Chem* 2005;280(7):5611-21.
31. Riedl T, Hanaoka F, Egly JM. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J* 2003;22(19):5293-303.
32. Smet-Nocca C, Paldi A, Benecke A. *De l'épigénomique à l'émergence morphogénétique: édition Belin; 2006.*
33. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175(23):720-31.
34. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R and others. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998;396(6712):683-7.
35. Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY and others. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 1998;396(6712):674-9.
36. Couve A, Filippov AK, Connolly CN, Bettler B, Brown DA, Moss SJ. Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem* 1998;273(41):26361-7.
37. Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(4):274-86.
38. Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci* 2000;16(4):296-312.

39. Derjean D, Bertrand S, Le Masson G, Landry M, Morisset V, Nagy F. Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nat Neurosci* 2003;6(3):274-81.
40. Malcangio M, Bowery NG. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17(12):457-62.
41. Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L and others. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* 2001;31(1):47-58.
42. Loubser PG, Akman NM. Effects of intrathecal baclofen on chronic spinal cord injury pain. *J Pain Symptom Manage* 1996;12(4):241-7.
43. Couve A, Kittler JT, Uren JM, Calver AR, Pangalos MN, Walsh FS, Moss SJ. Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci* 2001;17(2):317-28.
44. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995;373(6516):663-4.
45. Lakowicz JR. principles of fluorescence spectroscopy: plenum publisher; 1999. 698 p.
46. Valeur B. Molecular fluorescence, Principles and applications. Weinheim: WILEY-VCH; 2005. 387 p.
47. Paras N P. introduction to biophotonics: Wiley Inter-Science; 2003.
48. Rech I, Luo G, Ghioni M, Yang H, X. XS, Cova S. Photon-Timing Detector Module for Single-Molecule Spectroscopy With 60-ps Resolution. *IEEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS* 2004;10(4):788-795.
49. Smith T. The Physical and Chemical Properties of Fluorescence Lifetime Dyes. In: AssayMetrics, editor; 2005.
50. Lakowicz JR, Szmajcinski H, Nowaczyk K, Johnson ML. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(4):1271-5.
51. Schweitzer D, Kolb A, Hammer M, Anders R. [Time-correlated measurement of autofluorescence. A method to detect metabolic changes in the fundus]. *Ophthalmologie* 2002;99(10):774-9.
52. Maarek JM, Marcu L, Snyder WJ, Grundfest WS. Time-resolved fluorescence spectra of arterial fluorescent compounds: reconstruction with the Laguerre expansion technique. *Photochem Photobiol* 2000;71(2):178-87.
53. Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 2004;22(4):445-9.
54. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 2002;297(5588):1873-7.
55. Hof M, Hutterer R, Fidler V. Fluorescence spectroscopy in biology. Wolfbeis OS, editor: springers series on fluorescence; 2005. 305 p.
56. Inoué S, Spring KR. video microscopy, the fundamentals.
57. Pawley JB. biological confocal microscopy. editor P, editor; 2006.
58. Diaspro A, Robello M. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. *J Photochem Photobiol B* 2000;55(1):1-8.
59. Jares-Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 2003;21(11):1387-95.
60. Valeur B. invitation à la fluorescence moléculaire. Université EDB, editor: De Boeck & Larcier; 2004.
61. Rizzo MA, Piston DW. High-contrast imaging of fluorescent protein FRET by fluorescence polarization microscopy. *Biophys J* 2005;88(2):L14-6.

62. Gautier I, Tramier M, Durieux C, Coppey J, Pansu RB, Nicolas JC, Kemnitz K, Coppey-Moisan M. Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophys J* 2001;80(6):3000-8.
63. Tramier M. Imagerie des déclins de fluorescence pour l'étude de la dynamique et des interactions de macromolécules en cellules vivantes. Paris: Paris 6; 2001.
64. Elson EL. Quick tour of fluorescence correlation spectroscopy from its inception. *J Biomed Opt* 2004;9(5):857-64.
65. Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990;248(4951):73-6.
66. Williams RM, Piston DW, Webb WW. Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry. *FASEB J* 1994;8(11):804-13.
67. French T, So PT, Weaver DJ, Jr., Coelho-Sampaio T, Gratton E, Voss EW, Jr., Carrero J. Two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy of macrophage-mediated antigen processing. *J Microsc* 1997;185(Pt 3):339-53.
68. Merola F, Rigler R, Holmgren A, Brochon JC. Picosecond tryptophan fluorescence of thioredoxin: evidence for discrete species in slow exchange. *Biochemistry* 1989;28(8):3383-98.
69. Tramier M, Gautier I, Piolot T, Ravalet S, Kemnitz K, Coppey J, Durieux C, Mignotte V, Coppey-Moisan M. Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophys J* 2002;83(6):3570-7.
70. Becker W. time-correlated single photon counting modules multi SPC software SPC-134 SPC-144 SPC-600 SPC-630 SPC-700 SPC-730 SPC-830. 2004.
71. Waharte F, Spriet C, Heliot L. Setup and characterization of a multiphoton FLIM instrument for protein-protein interaction measurements in living cells. *Cytometry A* 2006;69(4):299-306.
72. Volkmer A, Hatrick D, Birch D. Time-resolved nonlinear fluorescence spectroscopy using femtosecond multiphoton excitation and single-photon timing detection. *Meas Sci Technol* 1997(8):1339-1349.
73. Sjöback R, Nygren J, Kubista M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta Part A* 1999;51:7-21.
74. Hanley QS, Subramaniam V, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Fluorescence lifetime imaging: multi-point calibration, minimum resolvable differences, and artifact suppression. *Cytometry* 2001;43(4):248-60.
75. Lin HJ, Herman P, Lakowicz JR. Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry A* 2003;52(2):77-89.
76. Stern O, Volmer M. On the quenching time of fluorescence. *Z phys* 1919;20:183-188.
77. Nizak C, Monier S, del Nery E, Moutel S, Goud B, Perez F. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* 2003;300(5621):984-7.
78. Amplitude-systemes. Principales spécifications des laser t-Pulse. Volume 2006; 2006.
79. Kohler JJ, Schepartz A. Kinetic studies of Fos-Jun.DNA complex formation: DNA binding prior to dimerization. *Biochemistry* 2001;40(1):130-42.
80. Verger A, Buisine E, Carrere S, Wintjens R, Flourens A, Coll J, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Identification of amino acid residues in the ETS transcription factor Erg that mediate Erg-Jun/Fos-DNA ternary complex formation. *J Biol Chem* 2001;276(20):17181-9.
81. manuel du logiciel LCS. Leica; 2006.
82. Becker W, Bergmann A, Biscotti G, Ruck A. advanced time-correlated single photon counting technique for spectroscopy and imaging in biomedical systems. *Proc SPIE* 2004(5340).

83. Enderlein J, erdmann R. fast fitting of multi-exponential decay curves. *optics communications* 1997;134:371-378.
84. Lakowicz JR. *Principles of fluorescent spectroscopy*. New York: Plenum Publishers; 1999.
85. Bird DK, Eliceiri KW, Fan CH, White JG. Simultaneous two-photon spectral and lifetime fluorescence microscopy. *Appl Opt* 2004;43(27):5173-82.
86. Palm R. utilisation du bootstrap pour les problèmes statistiques liés à l'estimation des paramètres. *biotechnol. Agron. Soc. environ.* 2002;3(6):143-153.
87. Fan X, Wang L. Comparability of jackknife and bootstrap results: An investigation for a case of canonical analysis. *ournal of Experimental Education* 1996(64):173-189.
88. Carrere S, Verger A, Flourens A, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* 1998;16(25):3261-8.
89. Truong AB, Masters SC, Yang H, Fu H. Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins* 2002;49(3):321-5.
90. Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, Boyfield I, Wood MD, Russell RB, Price GW and others. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci* 2001;21(4):1203-10.

## **Matériel et méthodes:**

### **Préparation des solutions**

Les différentes solutions que nous avons utilisées au cours de cette étude ont été préparées à partir de solutions d'eau pure (MiliQ) auxquelles ont été ajoutées différentes concentrations du fluorophore concerné. Les observations ont été réalisées en plaçant 3 ml de solution dans une chambre comparable au système POC (Perfusion Open and closed Cultivation) commercialisé par la société Leica

Pour les mesures de caractérisation des acquisitions de temps de vie, l'acide picrique a été utilisé à concentration saturante, la fluorescéine à 20 $\mu$ M, les rhodamines 6G et b respectivement à 200nM et 100nM. Les solutions utilisées pour le FCS présentent quant à elles des concentrations comprises entre 10 et 100nM afin d'éviter de saturer notre volume d'observation.

### **Etudes réalisées en cellules.**

#### **Chapitre II, 1 :**

*Les cellules nécessaires à la caractérisation du système ont été cultivées par François Waharte (BCF, IRI, Lille).*

Les cellules HeLa ont été cultivées dans des flasques en plastique (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO) auquel a été ajouté 10% de sérum de veau fœtal, 4mM de L-glutamine et 5mM de pyruvate de sodium. Les cellules ont été déposées sur des lamelles de 32mm 12 heures avant la transfection. 1H avant transfection, le milieu est remplacé par un milieu contenant 100unités/ml de pénicilline/streptomycine puis les transfections ont été réalisées après précipitation de l'ADN par phosphate de calcium. Les observations ont été réalisées 24H après transfection en montant les lamelles sur les systèmes POC précédemment décrits. Le milieu de culture est alors remplacé par un milieu L15 sans rouge de phénol pour à la fois éviter toute fluorescence parasite et également pour stabiliser le pH au cours de l'expérience.

Le plasmide tandem CFP-YFP a été construit par *Frédérique Dewitte* en réalisant un sous-clonage de la CFP dans un vecteur YFP (Clontech) grâce aux sites de restriction

XhoI/BamH1. L'oligonucléotide (TCCGGACTCAGATCTCGAG) sert alors de lien entre les deux séquences codantes pour nos fluorophores.

## **Chapitre II, 2 :**

*La culture cellulaire et les constructions nécessaires à l'étude du complexe Jun/Fos ont été réalisées par Barbara Camuzeaux(UMR 8526, IBL, Lille).*

Les protocoles de culture cellulaire et de transfection sont identiques à ceux précédemment décrits pour les expériences du chapitre II, 1 pour les expériences réalisées en cellules vivantes. Les expériences de FRET par photoblanchiment de l'accepteur ont été réalisées sur les mêmes cellules après fixation avec 4% para-formaldéhyde pendant 20 mn et montage entre lame et lamelle (milieu de montage Immunofluor, ICN)

Les plasmides utilisés lors de nos différentes expériences et leurs modes d'obtention ont été précédemment décrits (88)

## **Chapitre II, 3 :**

*La culture cellulaire et les constructions nécessaires à l'étude du complexe CBP/TDG ont été réalisées par Amel Attmane (Systems Epigenomics, IRI, lille)*

Les cellules Cos-7 ont été cultivées dans un milieu de culture D-MEM supplémenté avec 2,5% de sérum de veau fœtal, du glucose 4,5g/l, de la pénicilline 10U/ml et de la streptomycine 10µg/ml (GIBCO). L'incubation est réalisée à 37°C dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été déposées sur des lamelles de 32mm 24 heures avant la transfection. Le milieu est alors remplacé par le milieu de transfection constitué d'un mélange approprié d'ADN et d'Exgen (Euromedex) dans l'Opti-MEM (GIBCO). Les cellules sont alors placées dans l'incubateur pendant 6h. La transfection est arrêtée par l'ajout sur les cellules du milieu habituel de culture.

Les plasmides utilisés ont été construits par *Arndt Benecke* et *Amel Attmane* par coupure enzymatique des plasmides codant pour les protéines sauvages de TDG et CBP suivi de leurs insertions respectivement dans pYFP-C1 et mCerulean-C1. Une mutation ponctuelle de TDG a ensuite été réalisée pour obtenir TDG-K330A inséré dans le pYFP-C1. Cette mutation a été réalisée grâce au kit *Quik Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*.

### **Chapitre III:**

*La culture cellulaire et les constructions nécessaires à l'étude du récepteur GABA<sub>B</sub> ont été réalisées par Sophie Laffray (Laboratoire de Physiopathologie des Réseaux Neuronaux Médullaires, INSERM E358, Bordeaux)*

Les cellules sont dissociées de la corde spinale lombaire d'embryon de rat (18 jours de développement) et mises en culture dans un milieu *Neurobasal TM* (Sigma), complémenté de *B27* et *Glutamax* (Sigma) sans ajout de sérum. Après 8 jours les cultures primaires sont transfectées par 400ng de plasmides appropriés et de la lipofectamine 2000 (Invitrogène). Les cellules sont alors incubées 6 H puis la transfection est stoppée par l'ajout du milieu de culture classique.

Nous disposions initialement des plasmides codant pour la protéine 14-3-3z étiquetée Flag à son extrémité N-terminale (89), et les sous-unités GABAB1b et GABAB2 étiquetées respectivement c-myc et hémagglutinine (HA) également à leur extrémité C-terminale (90). Les cDNA de GABA<sub>B1</sub> et GABA<sub>B2</sub> ont été modifiés à leur extrémité N-terminale par fusion avec l'eGFP (AA61) ou *t-dimer* DsRed (AA42)

Le cDNA de la protéine 14-3-3ζ a été modifié par addition de *t-dimer* DsRed à l'extrémité N-terminale. L'ensemble des constructions a été sous-cloné dans le vecteur d'expression mammifère pcDNA3.1

### **Outils nécessaires aux analyses des données.**

Différents outils ont été utilisés pour l'analyse des données :

- Le logiciel *Excel (Microsoft office)* a été utilisé pour les calculs de moyennes, d'écart type et d'intervalles de confiance.
- Les calculs de temps de vie à partir des distributions de temps d'émission des photons ont été réalisés grâce au logiciel *SPCImage (B&H)*.
- Le système de choix de modèle d'ajustement de temps de vie point par point (chap II.3.b) a été réalisé grâce à *MFS (Dave Trinel/Corentin Spriet, IRI, Lille)*, un plug-in pour *ImageJ* développé au sein du laboratoire.
- L'ensemble des conversions, et des autres traitements appliqués tout au long de ce manuscrit ont été réalisés sous *Titan (Dave Trinel/Corentin Spriet, IRI, Lille)*, logiciel développé sous *Matlab (MathWorks, Inc.)* et *C++*.

## **Publications associées à ce travail**

### **Dans le domaine de l'instrumentation et de l'analyse :**

Waharte F, Spriet C, Héliot L. *Setup and Characterization of a Multiphoton FLIM Instrument for Protein-Protein Interaction Measurements in Living Cells*. **Cytometry part A**, (2006)

Spriet C, Trinel D, Laffray S, Landry M, Vandebunder B, Barbillat J, Héliot L. *Setup of a fluorescence lifetime and spectral correlated acquisition system for two-photon microscopy*. **Review of Scientific Instruments**, (2006)

Spriet C, Trinel D, Waharte F, Deslee D, Vandebunder B, Barbillat J, Héliot L. *Correlated fluorescence lifetime and spectral measurements in living cells*. **Microscopy research and technique**, (in press)

### **Dans le domaine de la biologie :**

Camuzeaux B, Spriet C, Héliot L, Coll J, Duterque-Coquillaud M. *Imaging Erg and Jun transcription factor interaction in living cells using fluorescence resonance energy transfer analyses*. **Biochem Biophys Res Commun**, (2005)

### **Collaborations extérieures au travail de thèse :**

Bonnet D, Angyalosi G, Demory A, Santraine V, Boulet A, Spriet C, Héliot L, Gras-Masse H, Grandjean C. *Effect of glycoamphiphiles on the solubilization and dendritic cell uptake of a lipopeptide: a preliminary study*. **Mol Pharm**. (2005)

Pichavant M, Taront S, Jeannin P, Breuilh L, Charbonnier A.S, Spriet C, Fourneau C , Corvaia N, Héliot L, Brichet A, Tonnel A.B , Delneste Y and Gosset P. *Impact of bronchial*

*epithelium on dendritic cell migration and function: modulation by the bacterial motif KpOmpA. J Exp Med (in press)*

**Travaux en cours :**

Laffray S, Bouali-Benazzouz R, Spriet C, Desbarats P, Aubert S, Decossas M, Fossat P, Héliot L, Nagy F, Landry M. *Pathophysiological regulation of GABAB receptor heterodimerization*, (soumis à **Neuron**)

Spriet C, Trinel D, Vandebunder B, Héliot L. *More FRET contrast in lifetime imaging*. (en cours de revision pour **Biophys.J**)

Yockell-Lelièvre J, Cantin P, Spriet C, Malenfant P, Héliot L, deLaunoit Y, Audette M. *Ets1 and Stat1 interaction in IFN-g STIMULATED TRANSCRIPTION of ICAM-1*. (Fin de rédaction pour **JBC**)

Mies F, Spriet C, Héliot L, Shlyonsky V, Goolaerts A, Roch A. *Activation of epithelial Na<sup>+</sup> channel activity by polyunsaturated n-3 fatty acids: possible involvement of an A-kinase anchoring protein*. (En fin de rédaction)

Karpova T, Spriet C, Kim M, Kherrouche Z, Héliot L, McNally J. *Slow Cycling of the Yeast Transcriptional Activator Ace1p on CUP1 Promoter Coexists with Fast Cycling and Depends on Chromatin Remodelling* (en fin de rédaction)





## **Résumé :**

La cellule est un ensemble tridimensionnel complexe et dynamique. L'ensemble de ses fonctions est régulé par la formation de complexes multi-protéiques. L'étude de la formation de ces complexes dans la cellule est donc une question rencontrée de façon ubiquitaire en biologie. Différentes techniques permettent d'observer ces interactions moléculaires. Nous avons choisi d'utiliser l'étude fret par mesure de FLIM, cette technique étant le meilleur compromis entre invasivité et précision des résultats. En particulier, notre approche repose sur le comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC), cette technique étant la plus sensible et la plus précise.

Ce manuscrit présente les différentes optimisations que nous avons apportées aux systèmes de mesure de temps de vie classiquement utilisés en microscopie. Pour cela, nous avons tout d'abord optimisé l'instrumentation liée à cette technologie en implémentant de nouvelles solutions d'excitation et de mesures. Après une caractérisation de ces éléments, nous avons testé différentes améliorations de l'analyse des données, en particulier pour tenir compte de l'hétérogénéité des interactions lors d'expériences d'imagerie de temps vie de fluorescence réalisées sur cellule. Malgré ce système d'acquisition, différentes questions restent complexes à résoudre en utilisant les mesures de FLIM seules. Nous avons donc développé et caractérisé un système de mesures corrélées de spectre et de temps de vie de fluorescence (SLiM). L'exploitation de ces données dans les études de fret sera également discutée.

Chacun de ces systèmes de mesure de fret a été appliqué à différentes problématiques biologiques que nous détaillerons.

## **Abstract :**

The cell is a complex and dynamic 3d structure which functions are regulated by multi-proteins complexes formations. The study of these complex assemblies is then a ubiquitous question in biology. Several techniques allow molecular interactions studies in cell. We have chosen the fret studies performed by fluorescence lifetime measurements, while it is the best compromise between cell invasivity and results accuracy. Our approach relies on time correlated single photon counting (TCSPC), which is the most sensitive and precise lifetime determination method.

This manuscript presents the different optimizations we performed compared to classical lifetime measurement systems used in microscopy. First of all, we optimized instrumentation used in photon decay curves measurements with adapted excitation sources and detectors. After a rigorous characterization step of these new instruments, we have proposed several optimizations in data analysis, as for example a solution to take into account interactions heterogeneity during lifetime imaging experiment applied to cell studies.

Even with such an acquisition system, several questions remain really complex to address using lifetime measurements alone. We have then developed and characterised a correlated fluorescence spectrum and lifetime (SLiM) measurements system. Exploitation of SLiM data applied to fret will also be discussed.

Both those fret measurements systems have been applied to several biological questions from which we will develop the most representative along this manuscript