

UNIVERSITE PARIS XI  
Centre d'Orsay

Thèse

présentée par

Elodie Milhiet

pour obtenir le grade de

Docteur en sciences  
de l'Université de Paris XI

Sujet :

**Nanospectroscopie  
de molécules d'intérêt biologique**

soutenue le 27 septembre 2007 devant la commission d'examen :

M. Michael Canva	Examineur
M. Antoine Delon	Rapporteur
Mme. Marie-Pierre Fontaine-Aupart	Examinatrice
M. Robert Pansu	Rapporteur
M. Paul Tchénio	Directeur de thèse



UNIVERSITE PARIS XI  
Centre d'Orsay

Thèse

présentée par

Elodie Milhiet

pour obtenir le grade de

Docteur en sciences  
de l'Université de Paris XI

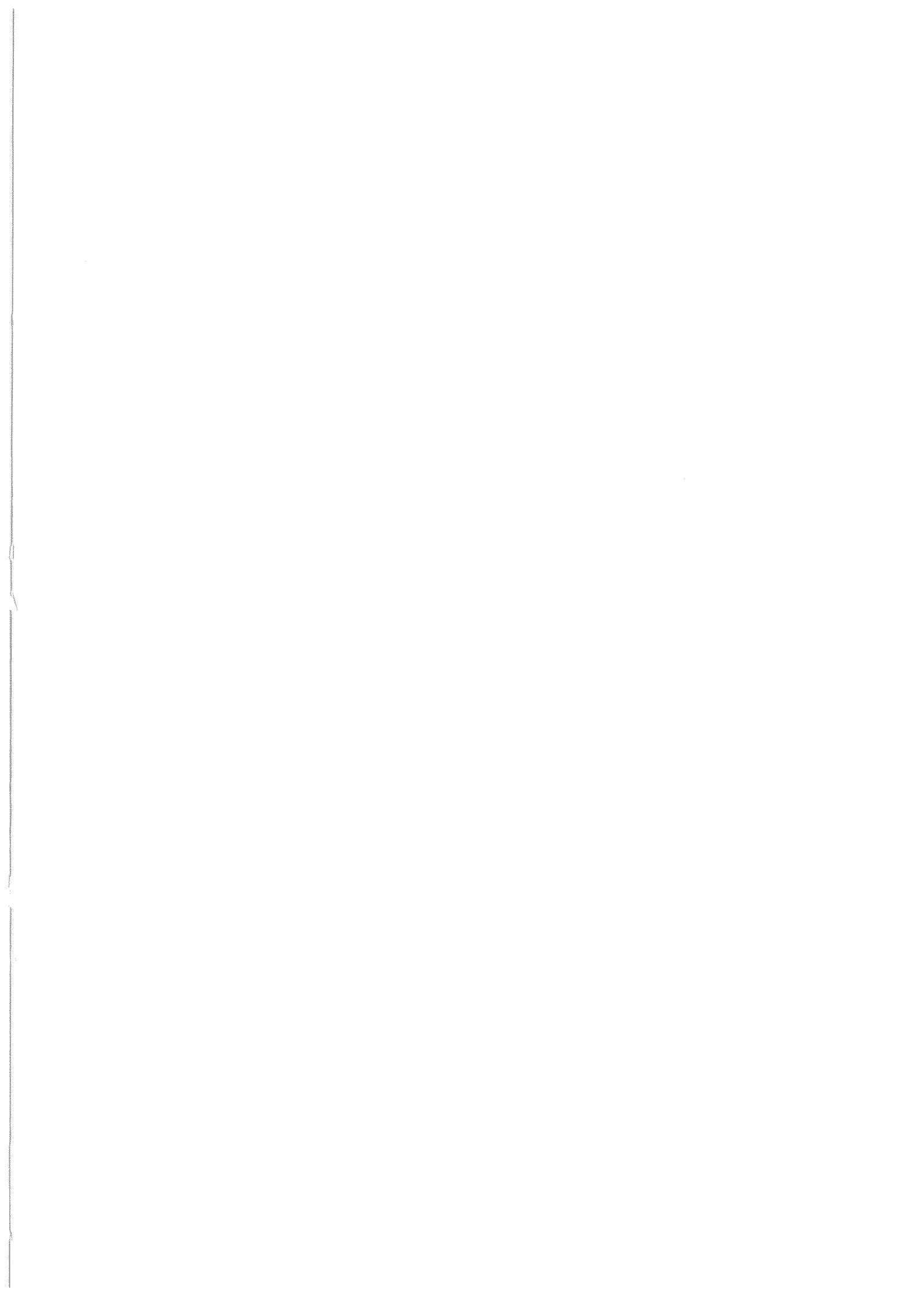
Sujet :

**Nanospectroscopie  
de molécules d'intérêt biologique**

soutenue le 27 septembre 2007 devant la commission d'examen :

M. Michael Canva	Examineur
M. Antoine Delon	Rapporteur
Mme. Marie-Pierre Fontaine-Aupart	Examinatrice
M. Robert Pansu	Rapporteur
M. Paul Tchério	Directeur de thèse







---

# Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier M. Pierre Pillet, directeur du laboratoire Aimé Cotton, pour m'avoir accueilli au laboratoire et pour m'avoir permis d'y mener à bien mes travaux de thèse.

Je suis très reconnaissante à M. Robert Pansu et M. Antoine Delon d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse. Je les remercie pour leurs critiques constructives et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également à Mme Marie-Pierre Fontaine-Aupart et à M. Michael Canva qui ont accepté de faire partie de mon jury.

Merci Paul de m'avoir initié aux joies de la biologie et de m'avoir éclairée sur les capacités fascinantes des drosophiles. Je tenais à faire part de toute ma gratitude à Anne Débarre et Matthieu Loumagne pour leur aide inestimable tout au long de ma thèse et en particulier cours du mois d'août dernier. Merci à Daniele Nutarelli pour son soutien et sa bonne humeur de tous les instants. Merci aussi à Alain Richard avec qui j'ai partagé la quasi-totalité de mes repas au cours de ces trois années et avec qui j'ai appris toutes sortes de choses. Merci à toute l'équipe de m'avoir accueillie, soutenue et d'avoir tant enseigné! J'en garderai un bagage inestimable!

Merci à toute l'équipe du laboratoire de "Gène et Dynamiques des Systèmes de Mémoire" de l'ESPCI pour leur collaboration et la préparation des échantillons que j'ai étudiés.

Je tiens également à remercier toute l'équipe des mécaniciens du laboratoire pour les nombreuses pièces qu'ils ont eu la gentillesse de me fabriquer en urgence et pour avoir essuyé les plâtres de mes erreurs de "vues de côté". Merci également aux membres de l'atelier de dessin pour les boîtes et jolies pièces qu'ils nous ont dessinées.

Merci Sylvie pour ta bonne humeur et ton soutien dans les moments difficiles.

---

Je tiens à adresser un immense merci à mes compagnons de galère Pierre, et les deux Guillaume grâce à qui la rédaction de ma thèse a pu se passer dans la joie et la bonne humeur, je garderai un souvenir immortel des quelques pots des rédacteurs et des "bonnes blagues" du vendredi. Merci aussi à Amodsen qui a supporté nos ronchonnements pendant toute cette période et pour toutes les belles histoires qu'il a pu nous raconter. Merci à Benoît pour l'attention qu'il m'a portée et pour ces massages relaxants devant mon écran d'ordinateur. Merci à Haeckel pour ses coups de main sous Scientifique Word. Merci à Walid de m'avoir cédé son bureau. Merci au Souverain Crozatier d'avoir partagé cette année de règne au conseil de Laboratoire. Merci aussi à tous les autres thésards du labo avec qui j'ai passé d'innombrables bons moments.

Merci également, à Alain Sarfati et Nouari Kebaili de m'avoir acceptée dans l'équipe des Doctoriales que j'ai eu le plaisir d'encadrer à trois reprises, et ce ne fût que du bonheur !

Je tenais également à remercier Amanda Trepagny, pour sa disponibilité et ses bons conseils.

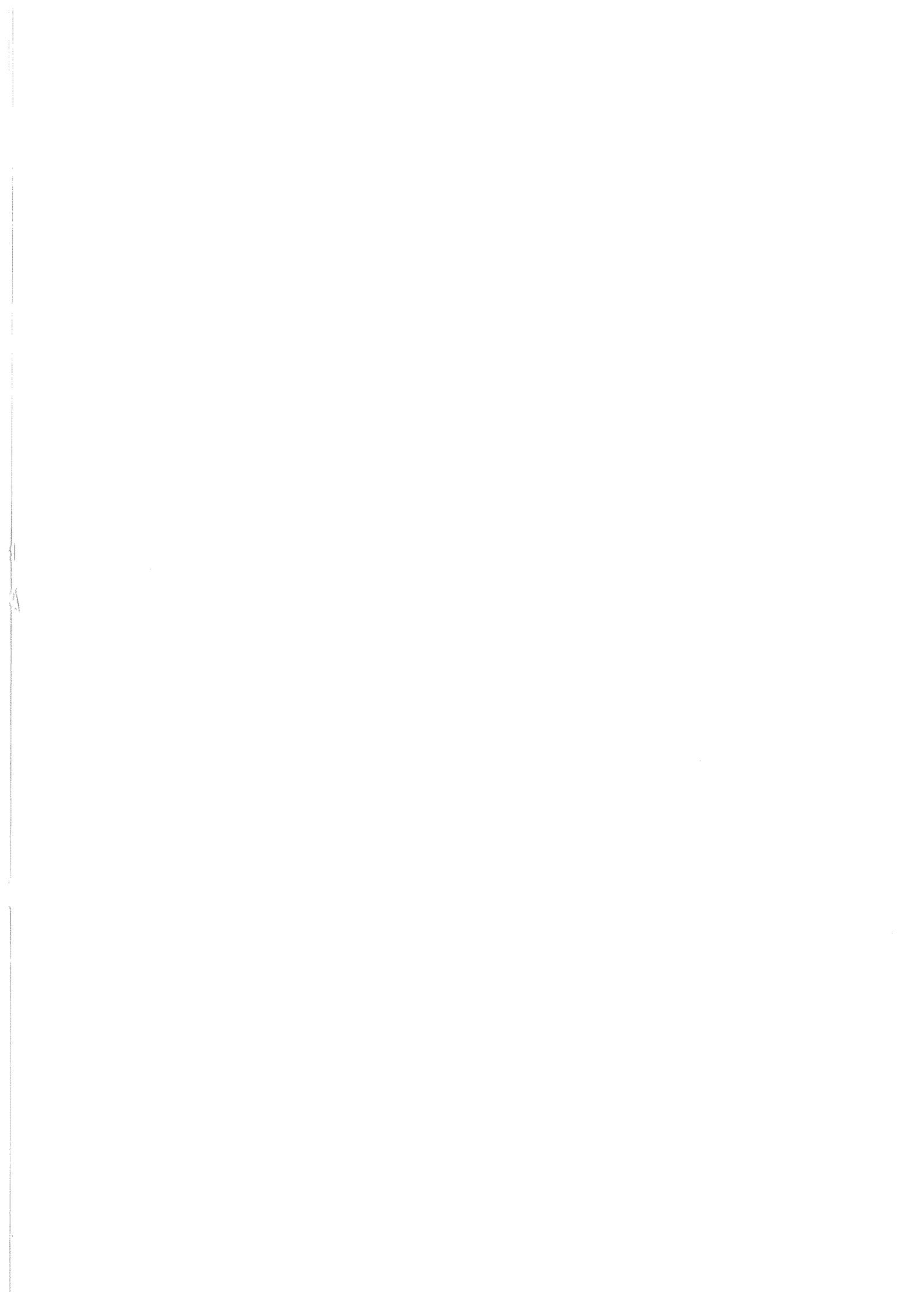
Je suis très reconnaissante envers René Farcy qui m'a permis de faire quelques vacances au cours de ces trois ans.

Merci à tous les autres membres du laboratoire grâce auxquels j'ai passé trois années exceptionnelles et qui ont tous contribué à faire de cette thèse ce qu'elle est aujourd'hui.

Merci à mes amis de m'avoir soutenue et encouragée de plus ou moins loin.

Merci à ma famille et à ma belle-famille d'avoir toujours été présentes dans les moments difficiles et de m'avoir encouragée, fait confiance et aidée du mieux qu'ils pouvaient.

Enfin, merci à toi Eric qui m'a supportée et soutenue pendant ces trois ans, en particulier pendant ces six derniers mois. Merci d'avoir pris sur toi et de m'avoir permis de surmonter les quelques crises auxquelles j'ai dû faire face.



## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>3</b>	<b>Les techniques de microscopie optique en champ lointain.</b>	<b>47</b>
3.1	L'objectif de microscope . . . . .	48
3.2	Les techniques de microscopie pour la molécule unique . . . . .	50
3.2.1	La microscopie grand champ . . . . .	50
3.3	La microscopie confocale . . . . .	54
3.4	La microscopie biphotonique . . . . .	56
3.4.1	Intérêt de la microscopie biphotonique . . . . .	56
3.4.2	Comparaison du volume focal à un et deux photons . . . . .	57
3.5	Visualiser les échantillons en lumière blanche . . . . .	59
 <b>III Caractérisation d'une sonde calcique par Spectroscopie de</b>		
<b>Corrélation de Fluorescence.</b>		<b>63</b>
<b>4</b>	<b>Motivations et principe de l'expérience</b>	<b>63</b>
4.1	Motivations . . . . .	63
4.2	Le principe de la FCS . . . . .	68
4.2.1	Introduction . . . . .	68
4.2.2	Approche théorique des bases de la FCS. . . . .	70
4.2.3	Modélisation de la diffusion en FCS . . . . .	73
4.2.4	Modélisation plus complète des différentes contributions. . . . .	75
<b>5</b>	<b>Système étudié et montage expérimental</b>	<b>80</b>
5.1	La sonde calcique . . . . .	80
5.2	Composition des échantillons . . . . .	84
5.2.1	Paramètres contrôlés lors de la préparation des échantillons . . . . .	84
5.2.2	Contrôle du pH . . . . .	85
5.2.3	Contrôle de la concentration calcique . . . . .	85
5.2.4	Détermination de la viscosité de la solution . . . . .	89
5.3	Le montage optique . . . . .	91
5.3.1	Les lignes d'excitation à un et deux photons . . . . .	91
5.3.2	La ligne de détection . . . . .	94

## TABLE DES MATIÈRES

---

5.4	Calibration du montage . . . . .	95
5.4.1	Calibration systématique du montage . . . . .	95
5.4.2	Caractérisation du volume focal . . . . .	96
<b>6</b>	<b>Résultats expérimentaux</b>	<b>99</b>
6.1	Optimisation des paramètres expérimentaux. . . . .	99
6.1.1	La force ionique . . . . .	99
6.1.2	Amélioration du rapport signal sur bruit : influence de la concentration d'Oregon green BAPTA 5N . . . . .	101
6.1.3	Étude de la saturation . . . . .	104
6.1.4	Etude spectrale . . . . .	108
6.2	Mesure des paramètres chimiques . . . . .	111
<b>7</b>	<b>L'expérience à deux photons</b>	<b>121</b>
7.1	Validation du système . . . . .	122
7.2	Calibration du volume focal . . . . .	123
7.3	Étude en longueur d'onde . . . . .	125
7.4	Dosage de l'OrgBapta5N. . . . .	126
7.5	Étude de la saturation . . . . .	129
7.6	Vérification de la sensibilité de la technique . . . . .	130
<b>IV</b>	<b>Détection de sondes ARN uniques par imagerie de fluores- cence</b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>L'expérience et son contexte</b>	<b>136</b>
8.1	Contexte et enjeux biologiques . . . . .	136
8.2	La mémoire olfactive chez la drosophile . . . . .	138
8.2.1	Le comportement . . . . .	138
8.2.2	Cycle et circuit de la mémoire olfactive . . . . .	140
8.3	Etat de l'art dans l'étude des gènes . . . . .	143
8.3.1	Les gènes acteurs de la mémoire . . . . .	143
8.3.2	L'hybridation-in-situ . . . . .	145

## TABLE DES MATIÈRES

---

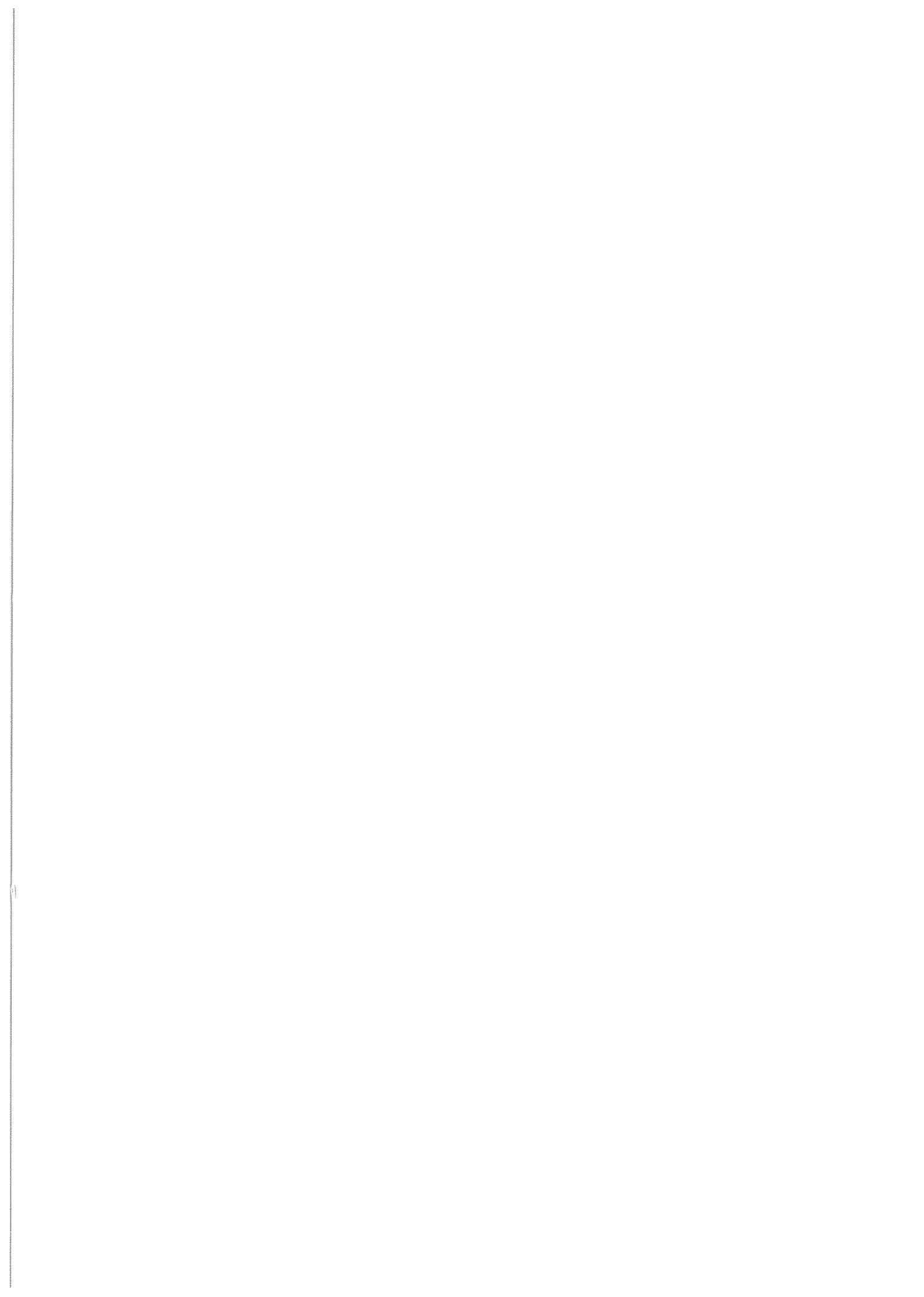
8.3.3	Vers un FISH quantitatif . . . . .	147
<b>9</b>	<b>Mise en place et optimisation du dispositif expérimental</b>	<b>149</b>
9.1	Choix initiaux : le montage et le fluorophore . . . . .	149
9.1.1	Choix du marqueur fluorescent et du système d'excitation . . . . .	149
9.1.2	Microscopie Confocale ou grand champ . . . . .	152
9.2	Le montage optique . . . . .	152
9.3	Optimisation du montage . . . . .	155
9.3.1	Homogénéisation de l'éclairage . . . . .	155
9.3.2	Suppression du speckle . . . . .	158
9.3.3	Correction des aberrations . . . . .	166
<b>10</b>	<b>Les échantillons et le protocole d'hybridation</b>	<b>173</b>
10.1	La cryosection . . . . .	174
10.1.1	La congélation ultra-rapide . . . . .	174
10.1.2	La cryoprotection . . . . .	175
10.2	L'hybridation des échantillons . . . . .	176
10.3	Fabrication des sondes ARN . . . . .	178
10.4	<i>GFP-Gal4</i> un modèle de validation . . . . .	180
<b>11</b>	<b>Validation et application de la méthode</b>	<b>182</b>
11.1	Validation sur un mutant GFP . . . . .	182
11.2	Application à un gène réel connu . . . . .	186
11.3	Étude du gène Tequila . . . . .	187
<b>12</b>	<b>Vers la détection de sondes uniques</b>	<b>194</b>
12.1	Détection de sondes ARN uniques en solution . . . . .	195
12.2	Détection des sondes dans les tissus biologiques . . . . .	197
<b>V</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>203</b>
<b>VI</b>	<b>Annexes</b>	<b>207</b>

## TABLE DES MATIÈRES

---

13 Annexe 1 : Titration de l'OrgBapta5N par l'EDTA	207
14 Annexe 2 : Modèle de saturation	209
15 Annexe 3 : Foucaultage	211
16 Annexe 4 : Évolution de la taille du faisceau gaussien à travers la ligne d'excitation	213

---





## Première partie

# Introduction

### Les nanosciences

"*Why cannot we write the entire 24 volumes of the Encyclopedia Britannica on the head of a pin?*", Richard P. Feynman (1959).

La fin du vingtième siècle a été marquée par une évolution scientifique et technologique majeure vers l'étude, la compréhension et la manipulation des propriétés de la matière à l'échelle atomique et du vivant à l'échelle moléculaire. Ce mouvement scientifique, désigné par le terme nanoscience, fut, semble-t-il, pressenti par R. Feynman, dès 1959 (<http://www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html>). Cependant, il ne pût se développer réellement que lorsque les scientifiques furent capables d'observer le nanomonde, à savoir lorsqu'apparurent, au début des années 80, les premiers microscopes de champ proche (microscopes à effet tunnel, STM; microscopes à force atomique, AFM), permettant de résoudre des objets nanométriques et lorsqu'une décennie plus tard les avancées technologiques ont rendu possibles les premières détections de molécules uniques. Les nanosciences constituent un véritable courant interdisciplinaire qui a pour composantes la miniaturisation, l'observation à une échelle réduite, l'élaboration ou l'étude d'objets très petits et qui s'étant de la microbiologie (biopuces, moteurs moléculaires, vecteur de médicaments, ...) à l'informatique quantique (cryptographie, cristaux photoniques, ...).

Au centre des technologies de l'information, de la communication et des sciences du vivant, nanosciences et nanotechnologies constituent un secteur stratégique, en croissance rapide. Les enjeux économiques sous-jacents ont permis le lancement de nombreux et vastes programmes de recherche, aussi bien aux Etats Unis, qu'au Japon ou dans les états de l'Union Européenne. Les nanobiosciences comme la manipulation et l'étude d'objets individuels figurent parmi ces thématiques prioritaires.

Les cellules, briques de base de tous les organismes vivants, sont des structures micro-métriques, théâtre de réactions chimiques s'effectuant dans des volumes de quelques picolitres. À travers les parois de ces unités fonctionnelles, souvent par des pores nanométriques,

---

transitent de nombreuses entités, molécules, protéines, virus, organelles, elles-mêmes nanométriques. L'étude biologique et biophysique de ces acteurs s'inscrit donc dans le domaine des nanosciences. La convergence biologie nanosciences se traduit sur deux fronts. Elle se caractérise d'une part, par une approche Top-Down (démarche descendante) de miniaturisation des outils d'investigation et d'analyse, tels que les endocapteurs et, d'autre part, par une approche Bottom-up (démarche ascendante) visant à comprendre le fonctionnement des organismes vivants macroscopiques en étudiant les acteurs nanométriques mis en jeux.

### **Microscopie et spectroscopie de molécule unique**

*"Atoms on a small scale behave like nothing on a large scale"*, Richard P. Feynman (1959).

Dans le cadre de ces études nanobiologiques, le développement des techniques d'investigation optiques telles que la microscopie confocale, biphotonique, la vidéomicroscopie, celui des traitements post-acquisition, et d'autre part, la synthèse de nouvelles sondes fluorescentes (fluorophores) ont ouvert la voie vers l'étude et la visualisation de processus biologiques jusqu'alors inaccessibles. Leur quantification à l'échelle de la cellule unique et même à l'échelle de la molécule unique est désormais chose possible. Ces avancées technologiques, ainsi que celles ayant contribué à l'optimisation de la résolution temporelle, ont conduit à la mise au point de techniques et systèmes d'étude capables de fournir des résultats pertinents sur la stoechiométrie et la dynamique des interactions moléculaires impliquées dans la régulation cellulaire. L'étude des modifications des propriétés spectrales et biochimiques des objets en fonction de l'environnement (propriétés de sonde locale) donne accès à des dynamiques (conformation, interactions moléculaires, mouvements ioniques, pH, température, ...) qui peuvent être analysées en solution et parfois même dans des tissus biologiques vivants.

Un des enjeux majeurs en nanobiologie est l'étude des processus biochimiques *in vivo* à une échelle réduite. Pour ce faire, la condition nécessaire à l'obtention de résultats fiables est bien évidemment l'utilisation de méthodes et d'outils ne modifiant pas les mécanismes analysés. Ainsi, l'intérêt de travailler avec un faible nombre de molécules sondes apparaît comme un moyen de satisfaire cette exigence. Ce type d'approche présente l'avantage d'être faiblement invasif et donc d'engendrer une perturbation minimale sur les systèmes examinés. Au vingt et unième siècle, les techniques de spectroscopie et de détection de molécules uniques se sont avérées être des outils émergents pour les études du vivant comme de la matière. En effet,

examiner des objets, molécules, complexes macromoléculaires (tels que les ribosomes), pris individuellement permet de s'affranchir des hétérogénéités présentes à l'échelle macroscopique et donc de remonter aux propriétés individuelles des objets constituant la population étudiée. Lorsqu'appliquées à l'étude de dynamiques réactionnelles, elles permettent d'échapper aux problèmes de synchronisation auxquels se heurtent généralement les approches macroscopiques. Les propriétés de sonde locales des molécules uniques offrent, de plus, la possibilité d'étudier le milieu dans lequel elles évoluent et respectivement l'impact de l'environnement sur leurs caractéristiques (photophysiques, photochimiques, réactionnelles, etc.).

Elles ont conduit à de nombreuses avancées aussi bien en microscopie de champ proche, au travers de l'étude des forces d'interactions moléculaires (Spectroscopie de force), en spectroscopie Raman (exaltation du signal Raman par des nano-objets SERS), qu'en spectroscopie et microscopie de fluorescence (imagerie de fluorescence ; Spectroscopie de corrélation de Fluorescence, FCS ; Transfert d'énergie de Förster, FRET ; Imagerie de temps de vie de fluorescence, FLIM ; ...). En contre partie, elles nécessitent l'implémentation de systèmes de détection capables de mesurer des signaux extrêmement faibles et l'interprétation des résultats doit se faire prudemment par une étude statistique sur un grand nombre d'individus. Toutefois, bien que loin d'être faciles à mettre en oeuvre, les études en molécules uniques présentent de tels avantages, qu'elles font l'objet de nombreux travaux parmi lesquels mon projet de thèse.

À l'interface entre optique et biologie, mes travaux ont visé à développer et mettre en oeuvre des techniques dérivées de la spectroscopie de molécules uniques afin, d'une part, d'étudier une dynamique chimique et, d'autre part, de quantifier des processus d'expression génétiques.

Les efforts de recherche déployés afin de pouvoir accéder à des dynamiques plus rapides, mettant en jeu un nombre de molécules toujours plus faible, ont stimulé le développement de nouvelles sondes plus intenses, plus stables et plus spécifiques. La synthèse de ces sondes, présentant des propriétés spectrales plus variées et mieux définies, est devenue un enjeu majeur visant à satisfaire les exigences toujours plus strictes des études réalisées. Néanmoins, beaucoup de ces nouvelles sondes n'ont pas encore été caractérisées et le manque d'information sur leurs propriétés photophysiques, photochimiques et sur leur dynamique temporelle, limite

---

grandement le spectre de leurs applications, ainsi que la pertinence des résultats auxquels elles peuvent conduire. L'absence d'outil d'analyse précis, nous a poussé à nous pencher sur mise au point d'une technique de caractérisation de ces dernières. Nous avons donc travaillé au développement d'une méthode sensible de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) à l'échelle de la molécule unique. En effet, cette technique disposant, sur une large gamme temporelle, d'une bonne résolution et d'une grande sensibilité, nous est apparue comme une approche intéressante, adaptable *in vitro* comme *in vivo*, qui nous permettrait de résoudre la dynamique temporelle de la réponse de ces sondes. Appliquée pendant ma thèse à des échantillons *in vitro*, nous ne perdons pas de vue l'idée de pouvoir, par la suite, la mettre en oeuvre *in vivo*.

À l'heure actuelle, les avancées de la génétique, ont rendu possible le séquençage de nombreux génomes et l'obtention de mutations toujours mieux ciblées, autorisant ainsi la synthèse directe de certaines protéines fluorescentes, telles que la GFP, par insertion des séquences adéquates dans des emplacements choisis du code génétique. Les progrès dans ce domaine, avec le développement de protéines de fusions entre un chromophore et un senseur ionique ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ , ...) ou un antigène spécifique, ont ouvert la porte à de nombreuses études visant à localiser, à quantifier et à étudier la mobilité (étude de la diffusion des éléments marqués par spectroscopie de corrélation de fluorescence) des éléments ciblés. Il serait aussi intéressant de pouvoir quantifier l'expression de protéines naturelles (non génétiquement modifiées). Mais, les méthodes d'immunohistochimie ou d'hybridation-*in-situ* actuellement utilisées font appel à des processus enzymatiques d'amplification des signaux pour atteindre un niveau de signal détectable ce qui altère fortement le caractère quantitatif des mesures. Afin de répondre à ce problème, dans le cadre de travaux visant à l'étude des mécanismes de mémoire, nous avons travaillé au développement d'un protocole de marquage quantitatif des ARNs impliqués dans la mémoire et du système d'imagerie associé, optimisé pour la détection de sondes uniques. De cette façon, nous avons cherché à localiser, au sein du réseau neuronal des drosophiles, les régions du cerveau utilisées et à quantifier les variations d'expression des gènes impliqués lors de la mise en place de la mémoire. Là encore, mes travaux constituent le premier pas vers une détection quantitative *in vivo* visant à comprendre le fonctionnement de la mémoire chez un système modèle : la drosophile.

## Plan de thèse

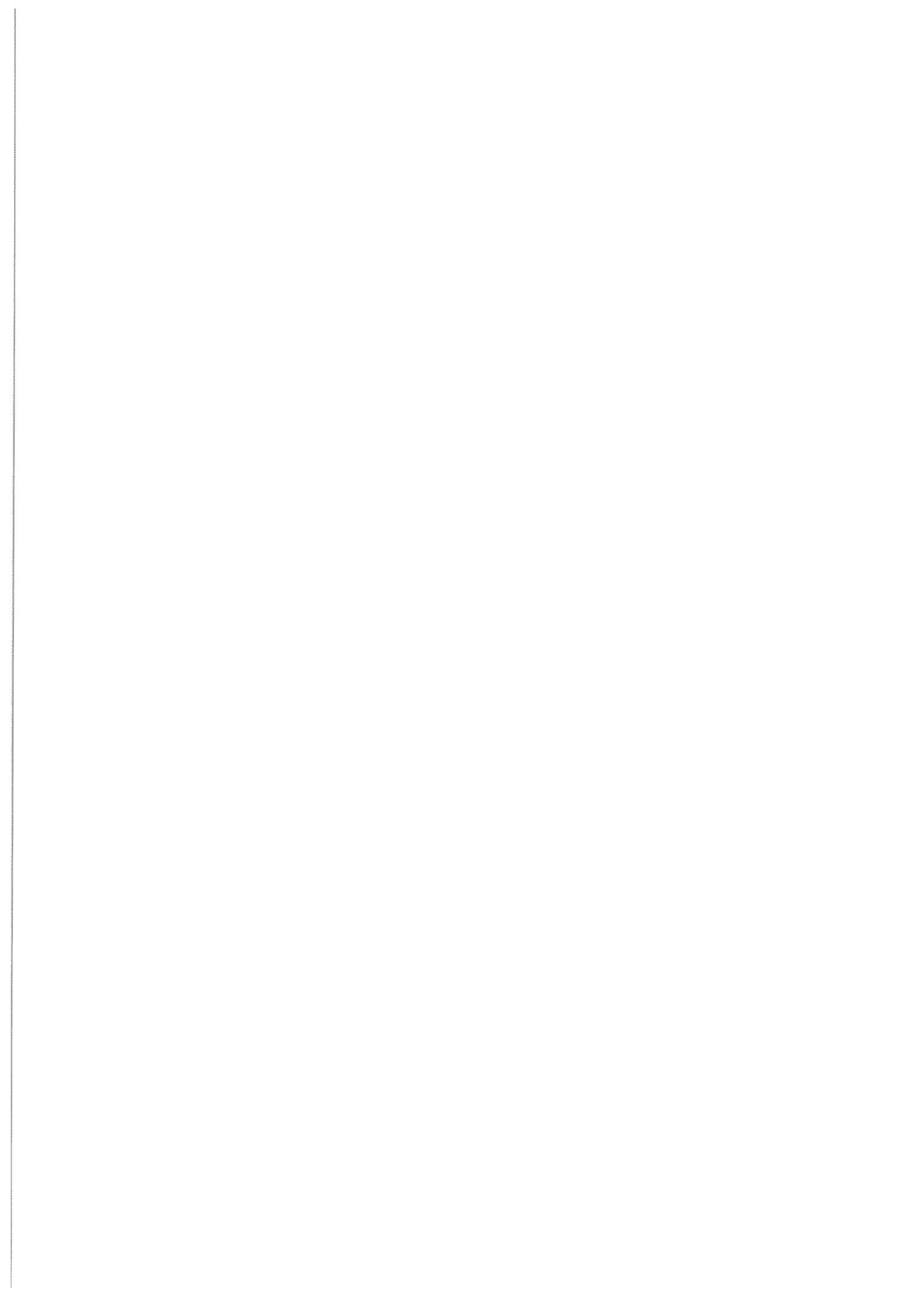
Les travaux que j'ai réalisés pendant ma thèse s'inscrivent dans le contexte scientifique que je viens de présenter. Essentiellement expérimentaux, ils ont consisté en deux études, chacune d'elles visant à développer un outil optique exploitable à des fins biologiques. J'ai, d'une part, travaillé à l'adaptation d'un système de microscopie confocale en vue de réaliser une expérience de spectroscopie corrélation de fluorescence en molécules uniques. L'objectif premier du développement de ce système optique fut la mise au point d'une technique sensible capable de caractériser la dynamique de sondes calciques encore mal connues telles que l'Oregon Green Bapta 5N qui m'a permis de valider notre approche. D'autre part, j'ai monté un système d'imagerie grand champ optimisé pour la détection de sondes ARN fluorescentes uniques dans le but de quantifier et de localiser l'expression de gènes de mémoire dans le cerveau des drosophiles.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, je rappelle les principes de base indispensables à la compréhension des deux chapitres suivants. Pour commencer j'introduis le principe de l'émission de fluorescence, les grandeurs caractéristiques déterminantes pour le choix d'un marqueur fluorescent adapté à l'expérience, puis je décris le fonctionnement de quelques-uns de ces marqueurs. Dans un second temps, j'explique l'utilité de mettre en oeuvre une expérience à l'échelle de la molécule unique ainsi que les difficultés que cela implique, puis je m'intéresse la problématique du bruit de fond dans de telles expériences. Dans le paragraphe suivant, je fais le point sur les techniques de microscopie que j'ai développées et mises en oeuvre aux cours de mes expériences. Je commence par détailler les éléments clef de tout microscope puis les techniques de microscopies grand champ et confocale appliquées aux études de molécules uniques. Je présente ensuite le principe de la microscopie à deux photons en effectuant un parallèle entre cette technique et les précédentes. Pour finir, je décris brièvement le fonctionnement de l'imagerie en lumière blanche à laquelle j'ai eu recours pendant ma thèse.

Le second chapitre est consacré à l'expérience de spectroscopie de corrélation de fluorescence. De ce fait, dans le premier paragraphe j'expose d'une part les motivations de l'expérience et d'autre part le principe de la technique de FCS ainsi que le formalisme qui lui est associé. Je détaille ensuite le dispositif expérimental et le système étudié. Dans ce paragraphe,

j'explique le fonctionnement de la sonde calcique, puis je décris la composition chimique des échantillons étudiés, le montage expérimental développé au cours de ma thèse et la façon dont nous avons procédé afin de la calibrer. Les deux derniers paragraphes de ce chapitre sont consacrés à la présentation et à l'exploitation des résultats expérimentaux. En premier lieu, je décris l'expérience réalisée avec une excitation monophotonique, les optimisations que nous avons été amenés à faire puis les résultats à proprement dits. Enfin, je clos ce chapitre en exposant les résultats préliminaires que nous avons obtenus avec une excitation biphotonique.

Le dernier chapitre de mon manuscrit est dévolu à la seconde expérience à laquelle j'ai pris part. Cette dernière s'inscrit dans le cadre d'une vaste étude biologique sur la mémoire s'appuyant sur un modèle animal : la drosophile. J'y présente le contexte biologique, les objectifs de l'expérience ainsi que les notions d'hybridation-in-situ et la technique particulière d'hybridation-in-situ de fluorescence que nous avons mise en oeuvre. Le second paragraphe de ce chapitre décrit le dispositif expérimental, justifie nos choix initiaux (type de microscopie, sonde fluorescente), puis explique les optimisations que nous y avons apportées, à savoir l'homogénéisation de l'éclairage, la suppression du speckle et la correction des aberrations. Le troisième paragraphe est consacré aux échantillons. J'y décris le système biologique étudié : le circuit de la mémoire olfactive chez la drosophile. Je définis ensuite le processus d'obtention des échantillons incluant le conditionnement des mouches, la synthèse des sondes ARN et l'hybridation en elle-même. Dans le paragraphe suivant, je présente les expériences réalisées pour valider la méthode, puis celles qui nous ont permis d'étudier un gène réel. Pour terminer ce chapitre je décris nos expériences visant à détecter et à compter des sondes uniques, en commençant par une expérience en solution puis dans les tissus hybridés.





## Deuxième partie

# L'outil optique pour la spectroscopie et l'imagerie de molécules uniques à intérêt biologique

## 1 La fluorescence.

La fluorescence est à la base de très nombreuses techniques modernes visant à l'étude du vivant, allant de la simple imagerie de fluorescence à des techniques spectroscopiques plus complexes telles que l'imagerie de durée de vie (FLIM), le FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), le FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), la FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*)... Ce phénomène découvert par les Chinois plus de 1500 ans avant JC, fut oublié puis de nouveau mis en évidence en 1565 par Nicolas Monardes qui observa l'interaction entre la lumière et une drogue extraite du *Lignum nephriticum*. La photoluminescence fut étudiée par de nombreux scientifiques au cours des siècles qui suivirent sa découverte, mais il fallut attendre 1853 avant que Stokes ne le désigne par le terme de fluorescence. Ce n'est qu'au début du vingtième siècle que naît la microscopie de fluorescence et que les diagrammes d'états d'énergie sont utilisés pour expliquer ce phénomène (Perrin, 1929 ; Jablonski, 1935). Dans ce premier paragraphe consacré à la fluorescence, je me concentrerai sur le cas des colorants (et de quelques protéines fluorescentes), en phase condensée, pour rappeler quelques points clefs. Ces colorants sont utilisés (dans ce travail) comme sondes de phénomènes biologiques, ce sont des marqueurs.

### 1.1 Structure des niveaux d'énergie

La structure énergétique d'une molécule est bien plus complexe que celle d'un atome isolé et les molécules organiques, auxquelles je ferai référence tout au long de mon manuscrit, le sont d'autant plus qu'elles contiennent un grand nombre d'atomes, donc de noyaux et

d'électrons. La description théorique de la structure (agencement géométrique, dans l'espace, des différents atomes) de telles molécules est un problème extrêmement complexe. Si on s'intéresse au cas le plus simple d'une molécule diatomique isolée, voyons comment remonter aux valeurs propres  $E$  de l'équation de Schrödinger  $\hat{H}\Psi(\vec{x}, \vec{R}) = E\Psi(\vec{x}, \vec{R})$ , où  $\vec{x}$  et  $\vec{R}$  correspondent respectivement aux coordonnées électroniques et nucléaires et où  $\hat{H}$  l'opérateur hamiltonien du système s'écrit :

$$\hat{H} = \hat{T}_N + \hat{T}_e + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{NN} = \hat{T}_N + \hat{H}_e + \hat{H}_{StructureFine} \quad (2.1)$$

$\hat{T}_N$ ,  $\hat{T}_e$ ,  $\hat{V}_{Ne}$ ,  $\hat{V}_{ee}$  et  $\hat{V}_{NN}$  représentent respectivement les énergies cinétiques des noyaux et des électrons et les potentiels d'interaction Coulombienne entre noyaux et électrons, électrons et électrons et enfin noyaux et noyaux. Le hamiltonien peut ainsi être écrit comme la somme d'un hamiltonien électronique  $\hat{H}_e$ , d'un hamiltonien nucléaire  $\hat{T}_N$  et d'un hamiltonien décrivant la structure fine des niveaux d'énergie.

On peut simplifier le problème en considérant que la vitesse de déplacement des électrons (temps caractéristiques de l'ordre de  $10^{-17}$ s) est bien supérieure à celle des noyaux (temps caractéristiques  $10^{-15}$  s, pour les déplacements les plus rapides correspondant aux vibrations nucléaires) dont la masse est beaucoup plus grande. Cette approximation appelée approximation de Born Oppenheimer, permet de réécrire la fonction d'onde  $\Psi(\vec{x}, \vec{R})$  sous la forme du produit des fonctions d'onde électroniques  $\phi_e^n$  et nucléaires  $\chi_N^n$ . Ainsi, en résolvant l'équation aux valeurs propres des fonctions d'ondes électroniques, pour chaque position  $\vec{R}_k$  des noyaux, on obtient l'ensemble des énergies potentielles des états électroniques considérés. En résolvant ensuite l'équation aux valeurs propres nucléaire, on obtient les niveaux d'énergie totale de la molécule  $E_n(\vec{R})$  et les fonctions d'ondes de vibration  $\chi_N(\vec{R})$ . Si on examine la contribution nucléaire à l'énergie, on peut la décomposer, en général, en une contribution principale liée aux vibrations internes de la molécule et une contribution plus faible liée à sa rotation.

Ainsi les niveaux d'énergie de molécule (cf. Figure 1 et 2) résultent de trois contributions sur lesquelles on s'appuie pour définir :

- Les niveaux électroniques ( $v$ ) : déterminés par les interactions électrostatiques entre électrons.

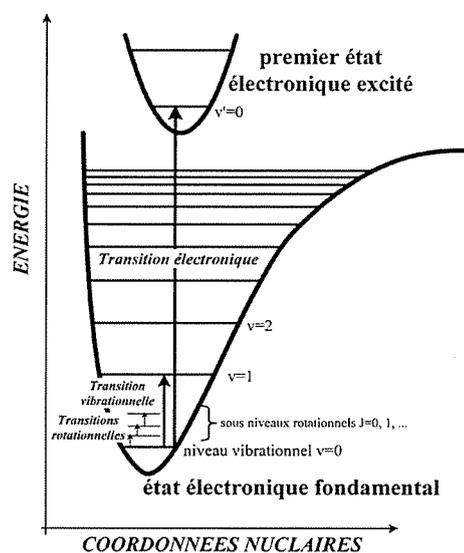


FIG. 1 – Diagramme schématisique des niveaux d'énergie d'une molécule isolée

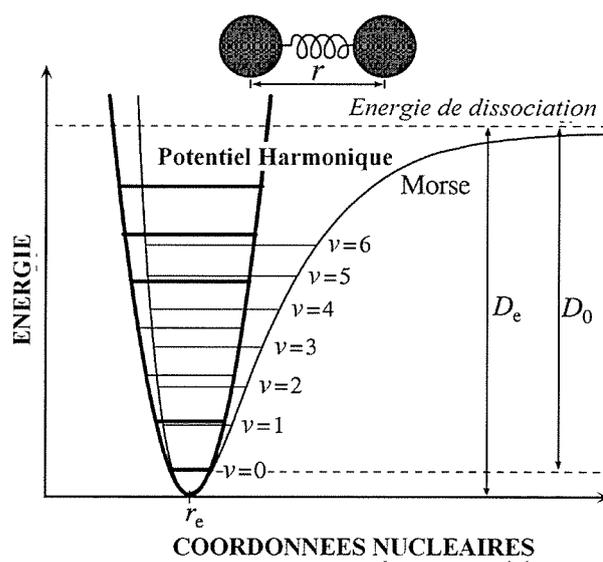


FIG. 2 – Potentiel de Morse et potentiel d'oscillateur harmonique (gras)

- Les niveaux vibrationnels ( $k$ ) : générés par les oscillations des noyaux correspondant aux fréquences de résonances possibles des liaisons chimiques entre atomes.

- Les niveaux rotationnels ( $l$ ) : reliés aux rotations de la molécule autour de son centre de masse.

Dans notre cas, la molécule doit être considérée dans le milieu qui l'entoure. Ce milieu modifie la position des niveaux d'énergie de la molécule ainsi que leur largeur. On peut préciser ceci en ajoutant que les niveaux électroniques sont plus sensibles à l'environnement que ne le sont les niveaux vibrationnels. À température ambiante, l'impact du milieu se traduit par un élargissement considérable du spectre (typiquement quelques GHz à quelques milliers de GHz) [28]. C'est l'élargissement homogène dû aux interactions incessantes et rapides (à l'échelle de la molécule, plus rapide que la durée de vie des niveaux excités) avec le milieu extérieur (chocs, phonons) qui conduisent à des temps de déphasages homogènes sub-nanoseconde à sub-picoseconde. Par ailleurs, dans une même population de molécules, plongées dans un milieu donné, en particulier dans les milieux amorphes (type polymères, verres, solgels [67]), chaque individu ne verra pas le même environnement immédiat. L'élargissement et la modification des niveaux d'énergie subis par chaque molécule ne sera donc pas exactement identique, mais sera régi par l'entourage direct de la molécule. On parle alors d'élargissement inhomogène. Ces modifications de la structure de bande des molécules sont souvent utilisées pour caractériser la matrice dans laquelle elles évoluent via des techniques de spectroscopie. Dans ce manuscrit je m'intéresse en particulier à la spectroscopie de fluorescence de molécule unique.

## 1.2 Le cycle d'excitation-déexcitation.

Le photon, quantum d'énergie électromagnétique, peut provoquer une transition des électrons entre deux orbitales moléculaires, quand son énergie correspond à la différence d'énergie entre ces deux orbitales. On appellera chromophore un corps capable d'absorber un photon dans le domaine visible, et fluorophore un corps capable d'absorber et de ré-émettre un photon.

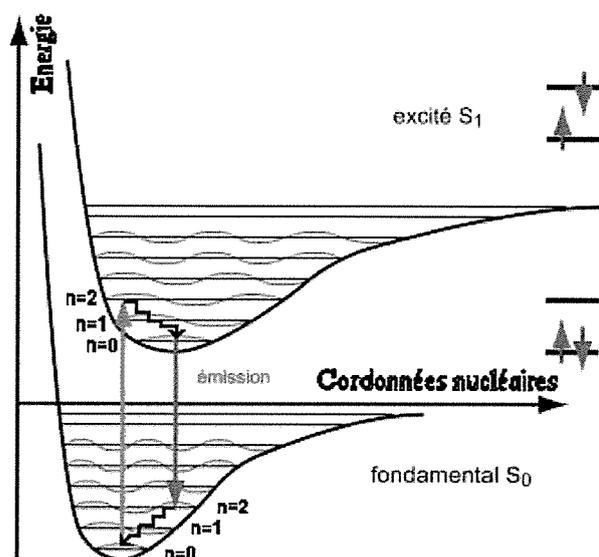


FIG. 3 – Représentation schématique des transitions énergétiques au cours du cycle de fluorescence. D'après le principe de Franck-Condon les transitions favorisées sont celles qui correspondent à un changement minimal dans les coordonnées nucléaires. Les fonctions d'ondes des niveaux vibrationnels  $n=0$  de l'état  $S_0$  et  $n=2$  de l'état  $S_1$  correspondent à une configuration favorable à la transition.

### 1.2.1 Le passage à l'état excité : absorption-relaxation.

L'absorption par un fluorophore d'un photon (ou de plusieurs photons simultanément) d'énergie  $h\nu$  ( $h$  constante de Planck,  $\nu$  fréquence) dans le cas d'une molécule organique se traduit généralement par une transition électronique très rapide ( $10^{-15}$ s) de l'état fondamental  $S_0$  (Highly Occupated Molecular Orbital) vers un niveau singulet  $S_i$  ( $i \geq 1$ ) d'énergie supérieure (cf. Figure 3). Durant cette transition rapide, l'interaction spin orbite est relativement faible, dans le cas des molécules organiques (atomes légers), et le hamiltonien d'interaction molécule/atome est indépendant du spin (approximation de Franck-Condon<sup>1</sup>). L'état fondamental de la plupart des molécules organiques stables étant généralement singulet, la transition électronique se fait de l'état singulet (spin total égale à 0) fondamental  $S_0$  vers un autre état singulet (spin total égale à 0)  $S_i$ .

Dans le cas où  $i$  est supérieur à 1, il s'en suit un phénomène non radiatif de conversion

<sup>1</sup>Selon le principe de Franck Condon la distance internucléaire ne doit pas changer lors du saut électronique. Du point de vue de la mécanique quantique, cela se traduit par le fait que, pour qu'un saut électronique se produise, les fonctions d'ondes associées aux deux états doivent se chevaucher.

interne qui ramène la molécule dans l'état  $S_1V_n$ . Une relaxation vibrationnelle très rapide (de l'ordre de la picoseconde), du fait de l'anharmonicité du potentiel électronique et du couplage de la molécule avec le milieu, engendre une transition du niveau vibrationnel  $V_n$  vers le niveau vibrationnel fondamental  $V_0$  de l'état  $S_1$ .

#### **Le retour radiatif à l'état fondamental : fluorescence-relaxation.**

Le retour à l'état fondamental  $S_0$  peut s'effectuer sous forme d'une désexcitation radiative accompagnée de l'émission d'un photon d'énergie inférieure à l'énergie d'excitation (on parle de décalage Stokes) : c'est la fluorescence (cf. Figure 3). Comme nous allons le voir, un certain nombre de processus radiatifs et non radiatifs tendent à faire diminuer la probabilité d'observer un rayonnement de fluorescence lors du retour du fluorophore à l'état fondamental. La désexcitation par fluorescence (gouvernée par la règle de Kasha) s'effectue à partir de l'état vibrationnel 0 de l'état électronique excité considéré, vers un niveau vibrationnel de l'état fondamental vérifiant le principe de Franck-Condon. Ainsi, le spectre de fluorescence reflète une partie de la structure vibrationnelle du niveau fondamental (de la même façon, si on considère que l'absorption s'effectue toujours à partir du même niveau vibrationnel de l'état fondamental, vers l'un des niveaux vibrationnels de l'état excité vérifiant le principe de Franck-Condon, on peut dire que le spectre d'absorption reflète une partie de la structure vibrationnelle du niveau excité dans lequel se situe la molécule après absorption d'un photon). Le spectre d'émission correspond à une gamme de longueurs d'onde plus grandes que le spectre d'absorption, comme en témoigne la figure 4 où sont présentés les spectres d'émission/absorption de quatre fluorophores utilisés au cours de ma thèse. Les pertes d'énergie lors de la relaxation vibrationnelle, les déplacements des niveaux électroniques dus à l'influence de l'environnement sur la structure de bande de la molécule et l'augmentation de la largeur de raie (élargissement inhomogène), affectés par le bain de modes de vibration de la matrice et les modes locaux (élargissement considérable à température ambiante puisque de l'ordre de plusieurs GHz), engendrent un décalage entre les maxima d'absorption et d'émission appelé décalage Stokes.

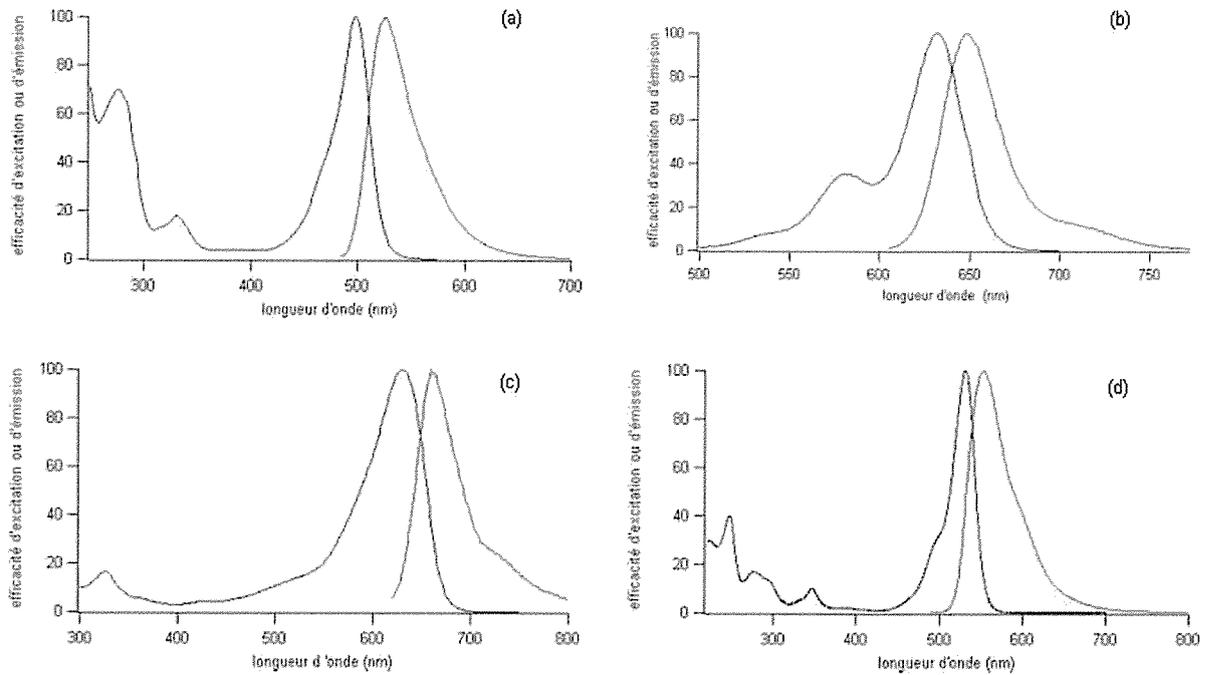


FIG. 4 – Spectres d’absorption et d’émission de différents fluorophores. (a) spectres de l’Oregon Green ; (b) spectres de l’Alexa fluor 633 ; (c) spectres du Nile Blue ; (d) spectres de la Rhodamine 6G.

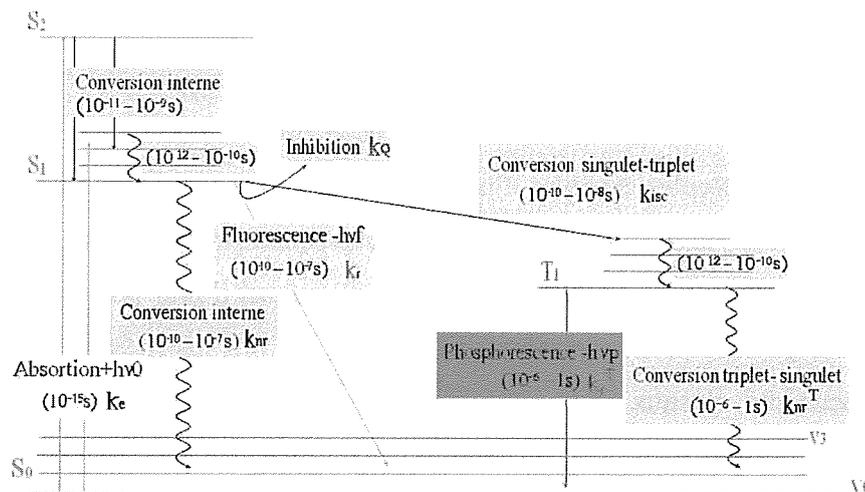


FIG. 5 – Diagramme de Jablonsky. Diagramme récapitulant les différents processus de transition énergétique pouvant avoir lieu suite à l’absorption d’un photon exciteur. Sont également mentionnés les différents temps caractéristiques associés à chacune des transitions représentées.

### 1.3 Les processus compétitifs.

Outre la fluorescence, de nombreux autres processus de désexcitation sont possibles (cf. Figure 5) :

- Désexcitation non radiative vers le niveau fondamental  $S_0$  par conversion interne. Ce processus de conversion interne ramène la molécule dans un état électronique de plus faible énergie par perte d'énergie de vibration ou de rotation
- Conversion (« Intersystem crossing ») de l'état singulet  $S_1$  vers l'état Triplet  $T_1$  (spin total égal à 1), puis, à l'issue du temps de vie de l'état triplet, désexcitation radiative sous forme d'un rayonnement dit de phosphorescence ou non radiative. La transition Triplet singulet, uniquement autorisée à partir d'un niveau excité, nécessite un changement du spin de l'électron (interaction spin orbite) dont la probabilité est plus faible qu'une transition singulet singulet. De ce fait, le taux de transition associé, du niveau  $T_1$  vers le niveau fondamental  $S_0$  est plus faible, sauf si la molécule comporte des atomes lourds.
- Absorption à partir d'un état excité. Celle-ci peut conduire au photoblanchiment de la molécule comme nous le verrons dans le paragraphe dédié à la photostabilité.
- Interactions intermoléculaires : transfert d'électrons, de protons, transfert radiatif, formation d'excimère<sup>2</sup> ou d'exciplexe<sup>3</sup>, etc., et changement de conformation de la molécule. Ces processus sont intimement liés aux paramètres physiques et chimiques caractérisant l'environnement de la molécule tels que la polarité, le pH, le potentiel électrique, la pression, la température, la viscosité, la force ionique et la présence de certaines molécules. En effet la présence de molécules capables d'inhiber ou de modifier la fluorescence, par exemple via des processus d'oxydoréduction [157], peut dramatiquement changer les propriétés de fluorescence d'un fluorophore, c'est donc un phénomène auquel il faut porter une grande attention lors de la préparation des échantillons.

À chacun des niveaux de la molécule est associé un temps de vie  $\tau_s$ , inversement proportionnel à la somme des taux de désexcitation radiative  $k_r^s$  et non radiative  $k_{nr}^s$  vers l'état

---

<sup>2</sup>Un excimère est un dimère dans l'état excité, formé suite à la collision d'une molécule excitée avec une molécule identique non excitée.

<sup>3</sup>Un exciplexe est un complexe excité formé par la collision entre une molécule excitée se comportant en donneuse d'électron (respectivement acceptrice d'électron) avec une molécule non excitée, de nature différente, capable d'accepter un électron (respectivement de fournir un électron).

fondamental :

$$\tau_s = \frac{1}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad (2.2)$$

Avec  $k_{nr}^s = k_{nr} + k_{isc} + k_Q$  (cf. Figure. 5)

La probabilité de transition par unité de temps (taux) associée à un processus donné est notée  $k_x^i$  ( $i$  correspond à l'état initial dans lequel se trouve la molécule et  $x$  se rapporte au processus provoquant la transition). Ci-dessus,  $k_r$  représente le taux de transition radiative,  $k_{nr}$  le taux de transition non radiative interne,  $k_{isc}$  le taux de transition vers l'état triplet, et  $k_Q$  le taux d'inhibition de la fluorescence (quenching) par les molécules de l'environnement. En s'appuyant sur ces probabilités, on définit le rendement quantique de fluorescence,  $\phi_f$ , qui correspond à la probabilité qu'une molécule dans l'état  $S_1$  émette un photon de fluorescence après l'absorption d'un photon (on omettra l'indice  $S_1$  dans l'équation 2.3 afin d'alléger l'expression) :

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_{isc} + k_Q} \quad (2.3)$$

## 1.4 L'absorption à deux photons

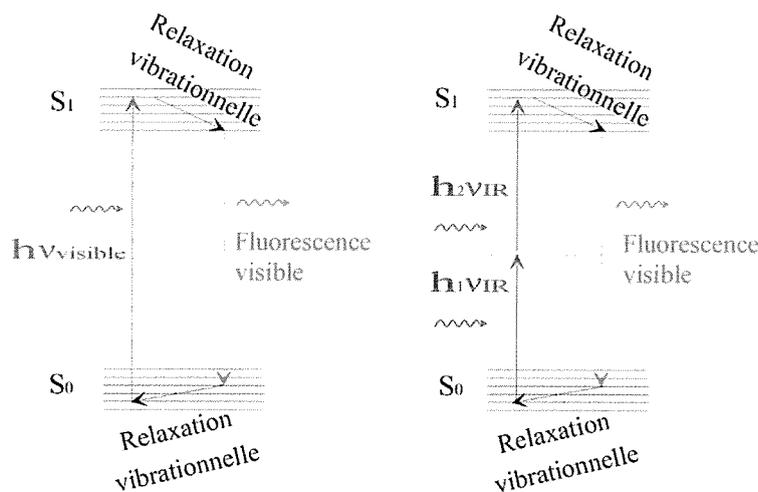


FIG. 6 – Comparaison des mécanismes d'absorption à un et deux photons.

Le principe physique de l'excitation biphotonique [80] repose sur l'absorption quasi simultanée (dans un intervalle de temps de l'ordre d'une femtoseconde) de deux photons d'énergies<sup>4</sup>

<sup>4</sup>On notera que  $\nu_1$  et  $\nu_2$  sont très peu différentes, mais du fait de la largeur spectrale relativement

$h\nu_1$  et  $h\nu_2$  peu différentes de la demi-énergie  $\frac{\Delta E}{2}$  de transition entre le niveau fondamental  $S_0$  et le niveau excité considéré  $S_1$  (cf. Figure 6). Le premier photon absorbé fait passer la molécule dans un état excité virtuel. Cet état ne correspondant pas à un état énergétique réel de la molécule, sa durée de vie est très courte (environ 1 fs). Si l'intensité excitatrice n'est pas suffisante, ce photon sera diffusé spontanément. Dans le cas contraire, deux autres processus non linéaires interviennent : la diffusion stimulée et l'absorption à deux photons. Ces deux phénomènes mettent en jeu un état virtuel de la molécule et sont gouvernés par une loi de Planck modifiée, telle que :

$$\text{Pour la diffusion : } \Delta E = h\nu_1 - h\nu_2$$

$$\text{Pour l'absorption à deux photons : } \Delta E = h\nu_1 + h\nu_2$$

En général, on observe un décalage du maximum d'absorption à deux photons vers les longueurs d'onde plus faibles que le double de la longueur d'onde d'excitation à un photon, conséquence des règles de parité sur la sélection des niveaux d'énergies. Ce phénomène est désigné par l'expression "blue shift" et est très bien traduit par la Figure 7 [168].

## 1.5 Paramètres caractérisant un bon marqueur fluorescent

Le choix d'un "bon marqueur fluorescent" dépend en partie de l'application visée, cependant quelle qu'elle soit, certains critères sont examinés systématiquement, afin de choisir un système capable de délivrer un signal de fluorescence détectable.

En microscopie et spectroscopie de molécule unique le choix d'un fluorophore, dans un environnement donné s'appuie sur un certain nombre de paramètres généraux, tels que : ses spectres d'absorption et d'émission, son rendement quantique, sa section efficace d'absorption, ou son facteur de mérite (brillance) (qui reflète les deux coefficients précédents), sa durée de vie radiative, sa photostabilité, et sa capacité à interagir ou non avec le milieu qui l'entoure.

Dans cette partie, je vais expliquer brièvement l'importance de ces paramètres et donner quelques ordres de grandeur, en me restreignant au cas d'une excitation monophotonique.

---

importante des lasers impulsionsnels, il est plus rigoureux d'adopter cette notation plutôt que de considérer  $\nu_1 = \nu_2$  qui n'est pas exactement vrai.

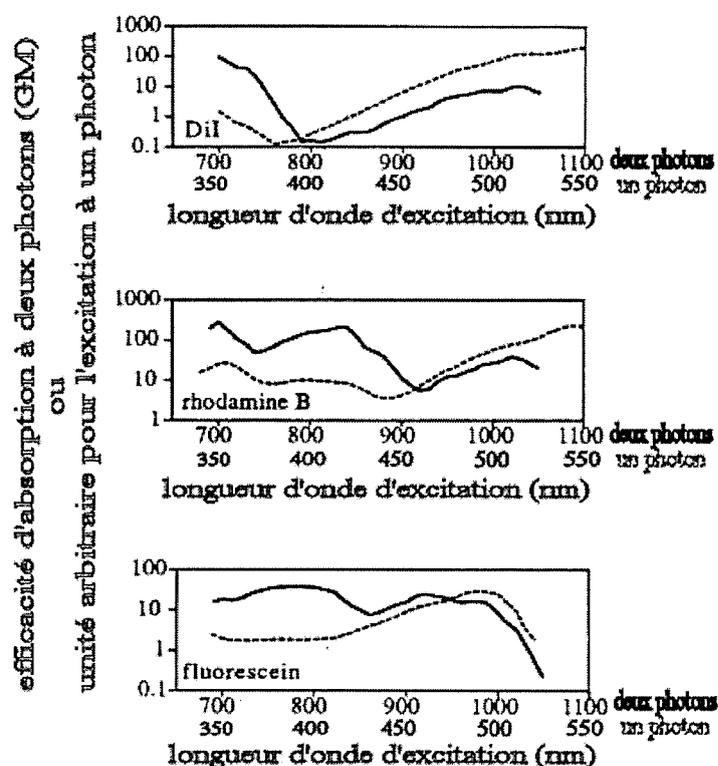


FIG. 7 - Comparaison entre spectres d'absorption à un (courbes en pointillés) et à deux photons (courbes en traits pleins), pour le DiI, la Rhodamine B et la fluorescéine (pH  $\approx$  13).

Cette figure est inspirée des résultats de C. Xu et al. publiés en 1996 dans le vol. 93 de Proc. Natl. Acad. Sci. USA (page 10764).

### 1.5.1 Les spectres d'émission et d'absorption

Le choix d'un fluorophore pour une expérience donnée s'effectue très souvent au regard des systèmes d'excitation et de détection dont dispose préalablement l'équipe de recherche. Outre ce critère de compatibilité, d'autres critères peuvent entrer en jeu. Dans les expériences de FRET (Fröster Resonance Energy Transfert) en particulier, le choix des fluorophores donneur et accepteur doit être méticuleusement effectué de sorte que, d'une part, les spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur se recouvrent et que, d'autre part, les spectres d'excitation (respectivement d'émission) du donneur et de l'accepteur soient bien distincts. D'une façon similaire, lorsque l'expérience met en jeu plusieurs corps fluorescents présents volontairement (multi-marquage, colocalisation), ou non (autofluorescence en milieux biologiques), dans la matrice d'étude, il est indispensable de choisir les spectres d'émission et d'absorption des différents éléments en présence de manière à pouvoir les distinguer les uns des autres (excitation sélective et détection sélective) et de limiter le bruit généré par un ajout des contributions parasites au signal utile.

### 1.5.2 Le rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence,  $\phi_f$ , dont l'expression est celle de l'équation 2.3 est, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, une mesure de l'efficacité avec laquelle une molécule excitée convertit l'énergie absorbée en émission de fluorescence. Typiquement, les fluorophores communément utilisés ont un rendement quantique de fluorescence compris entre 0,1 et 1. Dans le cas particulier d'une étude à l'échelle de la molécule unique, on utilisera plus volontiers des molécules dont le rendement quantique dépasse 70%. Ce facteur est extrêmement sensible à l'environnement dans lequel évolue le fluorophore, en particulier le pH, la température, la force ionique, le choix du solvant et la présence d'inhibiteurs de fluorescence. J'étudierai plus en détail le cas de l'Oregon Green Bapta 5N, au chapitre 3.

### 1.5.3 La section efficace d'absorption et la durée de vie radiative.

La section efficace d'absorption est définie à partir de la probabilité d'absorption d'un photon entre deux niveaux d'énergie différents  $i$  et  $j$ . Si on considère les molécules petites

devant la longueur d'onde d'excitation (approximation valable car on s'intéresse à des molécules dont la taille est de l'ordre d'une fraction de nanomètre à quelques nanomètres), on peut les assimiler à des dipôles ponctuels. Dans ces conditions, la section efficace d'absorption s'écrit, dans l'approximation de Born-Oppenheimer :

$$\sigma_{Abs}^{i \rightarrow j} \propto |\langle \chi_\nu^j | \chi_\nu^i \rangle|^2 \cdot |\langle \varphi_e^1 | \vec{\mu} \cdot \vec{n} | \varphi_e^0 \rangle|^2 \quad (2.4)$$

Où  $\varphi_e^i$  est la fonction d'onde électronique du niveau  $i$ ,  $\chi_\nu^j$  est la fonction d'onde nucléaire du niveau  $j$ , et  $\vec{n}$  est le vecteur normalisé du champ exciteur. Le premier terme traduit le recouvrement des orbitales moléculaires, c'est le facteur de Franck-Condon. Le second correspond à la composante du moment dipolaire  $\vec{\mu}$  de la molécule, parallèle au champ exciteur  $\vec{\mu}_{10}$ . Il caractérise l'efficacité du couplage dipolaire électrique entre l'état excité et l'état fondamental.

Typiquement la section efficace d'absorption d'un bon fluorophore est de l'ordre de  $10^{-16} \text{cm}^2$ .

Si la section efficace d'absorption traduit la probabilité d'absorption d'un photon et donc d'excitation de la molécule, la durée de vie radiative du niveau  $j$  de la molécule  $\tau_r^j$  est, quant à elle, reliée au taux de désexcitation radiatif  $k_r^j$  du même niveau. À basse température, lorsque les autres processus d'élargissement homogène sont bloqués, c'est la durée de vie radiative qui fixe la largeur homogène de la transition optique du système fluorophore-matrice étudié. On la définit ainsi :

$$\tau_r^j = \frac{1}{k_r^j} \quad (2.5)$$

On peut exprimer, la durée de vie radiative  $\tau_r^j$  en fonction de la section efficace d'absorption. En faisant l'approximation d'un spectre d'émission miroir du spectre d'absorption, Strickler et Berg ont montré que l'on peut calculer numériquement la durée de vie radiative, après avoir mesuré les spectres d'absorption et d'émission de la molécule, en appliquant la formule suivante [145] :

$$\frac{1}{\tau_r} = n^2 \times 2,88 \cdot 10^{-9} \langle \tilde{\nu}_f^3 \rangle \int \frac{\epsilon(\tilde{\nu}_a)}{\tilde{\nu}_a} d\tilde{\nu}_a \quad (2.6)$$

Où  $\tilde{\nu}$  est le nombre d'onde<sup>5</sup>, exprimé en  $cm^{-1}$ , se rapportant à la fluorescence ( $f$ ) ou à l'absorption ( $a$ ),  $n$  est l'indice de réfraction, le coefficient  $2,88 \cdot 10^{-9}$  s'exprime en  $mol.cm^4.s^{-1}.L^{-1}$ , et  $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire (unité  $L.cm^{-1}.mol^{-1}$  ou  $M^{-1}.cm^{-1}$ ), tel que :

$$\varepsilon(\nu_a) = \langle \cos^2 \theta \rangle \frac{1}{10^3 \ln 10} N_A \sigma_a(\nu_a) \quad (2.7)$$

Avec  $N_A$  le nombre d'Avogadro,  $\sigma_a(\nu_a)$  la section efficace d'absorption et  $\langle \cos^2 \theta \rangle$  est un facteur tenant compte de l'orientation moyenne des dipôles moléculaires ( $\langle \cos^2 \theta \rangle = \frac{1}{3}$  pour une orientation aléatoire).

On notera que la plupart des fluorophores présentent, pour une excitation à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption, un coefficient d'extinction molaire compris entre 5000 et 200 000  $M^{-1}.cm^{-1}$  [62].

Par ailleurs, il est important de souligner le fait que la durée de vie radiative dépend de l'indice de réfraction du milieu, et que ce n'est donc pas une propriété intrinsèque de la molécule.

#### 1.5.4 L'intensité de saturation

Si on considère un système présentant un bruit de fond faible, on peut imaginer, de prime abord, d'augmenter le taux d'excitation des molécules afin d'augmenter l'intensité du signal de fluorescence. Cependant, lorsque l'on augmente l'intensité laser d'excitation, la molécule passe de plus en plus de temps dans l'état excité. Or, lorsque cette molécule est dans un état différent de l'état fondamental, elle ne peut plus absorber le rayonnement exciteur correspondant à une transition de l'état fondamental vers l'état excité. Le taux d'émission de fluorescence est alors sujet à un phénomène dit de saturation. Il tend vers sa valeur maximale  $R_f^\infty$  et la section efficace apparente d'absorption  $\sigma_a(I)$  diminue.

Pour décrire ce phénomène, on définit l'intensité de saturation  $I_S$  comme l'intensité pour laquelle la section efficace d'absorption est divisée par deux :  $\sigma_a(I_S) = \frac{\sigma_{a0}}{2}$ , et logiquement on introduit l'expression de la section efficace apparente d'absorption  $\sigma_a(I)$  en fonction de

---

<sup>5</sup>On définit le nombre d'onde moyen de la façon suivante :  $\langle \tilde{\nu}_f^3 \rangle = \left[ \frac{\int F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int \tilde{\nu}^{-3} F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}} \right]$  avec  $F(\tilde{\nu})$  le spectre de fluorescence en nombre d'onde :  $\langle \nu_f^3 \rangle = \frac{\langle \tilde{\nu}_f^3 \rangle}{c^3}$ , où  $c$  correspond à la vitesse de la lumière dans le vide et  $\nu_f = \frac{c}{\lambda_f}$ .

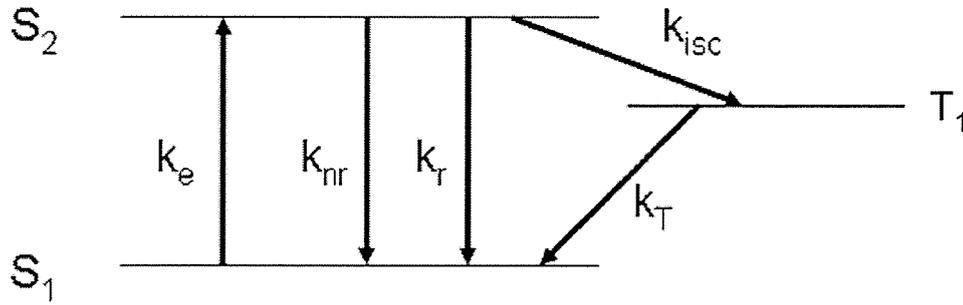


FIG. 8 – **Système modèle à trois niveaux.** Transitions possibles et probabilités  $k_x$  associées, dans un système modèle à trois niveaux. Ici  $S_3$  représente l'état triplet.

l'intensité de saturation :

$$\sigma_a(I) = \sigma_{a0} \frac{1}{1 + \frac{I}{I_s}} \quad (2.8)$$

La connaissance de l'intensité de saturation  $I_s$  et du taux limite d'émission  $R_f^\infty$  est très utile afin de caractériser une molécule fluorescente, puisque le rapport signal sur bruit et la probabilité de détection en dépendent.

Nous allons donc voir comment relier ces paramètres à ceux du système, dans le cas simplifié d'un système moléculaire fermé à trois niveaux effectifs  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$  (où  $T_1$  correspond à l'état triplet), présenté à la figure 8. Il est important de préciser que nous négligerons dans cette approche l'émission stimulée car, en réalité, les transitions considérées s'effectuent à partir de et/ou vers un des niveaux vibrationnels des niveaux d'énergie mis en jeu. Ce n'est donc pas réellement un système à trois niveaux, pour lequel nous n'aurions pas pu faire cette approximation. Les populations des trois niveaux considérés sont classiquement décrites par les équations de taux qui, en molécule unique, décrivent les probabilités d'occupation des niveaux considérés :

$$\begin{aligned} \frac{dP_1}{dt} &= -k_e P_1 + (k_r + k_{nr}) P_2 + k_T P_3 \\ \frac{dP_2}{dt} &= k_e P_1 - (k_r + k_{nr} + k_{isc}) P_2 \\ \frac{dP_3}{dt} &= k_{isc} P_2 - k_T P_3 \end{aligned} \quad (2.9)$$

Où  $k_e$  représente le taux d'excitation,  $k_r$  le taux de transition radiative,  $k_{nr}$  le taux de

transition non radiative interne,  $k_{isc}$  le taux de transition vers l'état triplet,  $k_T$  le taux de transition de l'état triplet vers l'état  $S_1$  et  $P_1$ ,  $P_2$ , et  $P_3$  les probabilités respectives, à un instant  $t$ , d'occupation des niveaux  $S_1$ ,  $S_2$ , et  $T_1$ . Pour le système ainsi défini, on peut écrire le taux de fluorescence en fonction de la population  $P_2$  du niveau excité  $S_2$  :

$$R_f = k_r P_2 \quad (2.10)$$

Où  $R_f$  est le taux d'émission de fluorescence saturé.

On considère un système fermé, qui vérifie :  $P_1 + P_2 + P_3 = 1$ . De ce fait, on peut résoudre le système 2.9 en régime stationnaire et on en déduit l'expression du taux de fluorescence, tel que :

$$R_f = R_f^\infty \frac{\frac{I}{I_S}}{1 + \frac{I}{I_S}} = \frac{k_e}{(k_r + k_{nr} + k_{isc}) + k_e K} \frac{1}{\tau_r} \quad (2.11)$$

Dans cette expression,  $K = 1 + \frac{k_{isc}}{k_T}$  traduit la possibilité d'un piégeage dans l'état triplet (dans le cas d'un système à deux niveaux  $K = 1$ ),  $\tau_r = \frac{1}{k_r}$  est la durée de vie radiative et  $R_f^\infty$  le taux limite d'émission de fluorescence [9]. Ce dernier s'exprime en fonction du taux d'émission radiative  $k_r$ , du taux d'émission non radiative  $k_{nr}$ , du taux de transition singulet-triplet  $k_{isc}$ , du taux de retour à l'état  $S_1$  à partir de l'état triplet  $T_1$   $k_T$ , et de l'efficacité de fluorescence  $\phi_f$  (cf. eq. 2.3), par la relation suivante :

$$R_f^\infty = \frac{(k_r + k_{nr} + k_{isc}) \phi_f}{2 + \frac{k_{isc}}{k_T}} \quad (2.12)$$

Et pour une excitation monophotonique, le taux d'excitation s'écrit :

$$k_e = \sigma_a^{1ph} \frac{I}{h\nu}, \quad (2.13)$$

Ainsi, lorsque ce dernier devient très important devant les taux de désexcitation moyens, le taux de fluorescence atteint sa valeur limite <sup>6</sup> :

$$R_f^\infty(k_e^{sat}) = \frac{1}{K\tau_r} \quad (2.14)$$

---

<sup>6</sup>On considère toujours un système à trois niveaux pour lequel on ne tient pas compte de l'émission stimulée d'où la différence d'un facteur 2 avec le résultat que l'on obtiendrait à partir des équations de block optiques[9].

On constate que cette valeur limite ne dépend aucunement du rendement quantique de fluorescence  $\phi_f$  mais uniquement de la durée de vie radiative et du piégeage dans l'état triplet matérialisé par le facteur  $K$  (pour un bon fluorophore  $K < 10$ ). En effet, le taux de fluorescence limite sera d'autant plus faible que la probabilité de piégeage dans l'état triplet sera grande (cas d'un mauvais fluorophore,  $K \gg 1$ ).

À la saturation ( $I = I_s$ ), d'après 2.11, on peut écrire l'expression du taux de fluorescence  $R_f$  :

$$R_f(k_e^{sat}) = \frac{R_f^\infty(k_e^{sat})}{2}$$

En combinant 2.11 et 2.14, on en déduit le taux d'excitation  $k_e^{sat}$  à la saturation :

$$k_e^{sat} = \frac{k_r}{\phi_f K} \quad (2.15)$$

On peut, d'après 2.14, 2.15 et 2.13, obtenir l'expression de l'intensité de saturation à un photon :

$$I_s[kW.cm^{-2}] = \frac{2}{\phi_f} \frac{h\nu}{\sigma_{a0}^{1ph}} \frac{k_r}{K} \quad (2.16)$$

On remarque que si le taux d'émission de fluorescence à la saturation  $R_f^\infty(k_e^{sat})$  ne dépend pas du rendement quantique de fluorescence  $\phi_f$ , l'intensité de saturation au contraire en dépend. Plus le rendement quantique sera faible, plus il faudra injecter de photons pour atteindre la saturation, ce qui, comme nous allons le voir, est important pour le rapport signal sur bruit. Il est également utile de souligner que la conséquence d'une trop forte dépopulation au profit de l'état triplet est une intensité de saturation faible et donc un taux d'émission de fluorescence maximum faible. On comprend bien qu'il est primordial de choisir un fluorophore pour lequel le taux de conversion intersystème singulet-triplet sera le plus petit possible.

### 1.5.5 Le facteur de mérite : brillance

Comme nous l'avons vu précédemment, afin d'obtenir un signal de fluorescence optimal, il faut consciencieusement choisir le système moléculaire (le fluorophore et la matrice dans lequel il évolue) en fonction de sa section efficace d'absorption, de son taux de conversion intersystème singulet-triplet et de son rendement quantique. Il est également indispensable de bien

choisir la source d'excitation afin de se placer au plus près du maximum d'absorption. En premier lieu, on peut évaluer un candidat en réalisant des mesures d'absorption en phase liquide sachant qu'à un bon colorant correspond un coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{\max}$  de l'ordre de  $10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Le rendement quantique de la molécule et le coefficient d'absorption molaire peuvent être regroupés en un facteur de mérite  $\epsilon_{\max} \phi_f$  que l'on appelle brillance. Le tableau 2.1<sup>7</sup> donne l'ordre de grandeur de ce facteur de mérite pour quelques fluorophores courants dans des solvants appropriés. On gardera à l'esprit que, pour ce dernier comme pour l'efficacité quantique, il faut tenir compte de la matrice d'étude qui influence grandement sa valeur.

	Excitation (nm)	Emission (nm)	$\epsilon$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	$\phi$	brillance	références
Fluorescéine (pH 7 PBS)	490	520	67 000	0,71	47 570	[61]
Cy5.18-amine (pH 7 PBS)	652	672	200 000	0,18	36 000	[103]
Cy3.18-amine (pH 7 PBS)	554	568	130 000	0,14	18 200	[103]
Oregon green 488 (pH 9 P)	494	518	82 400	0,97	78 300	[146]
EGFP (0,1 M NaOH)	488	509	53 000	0,60	31 800	[111], [153]
Rhodamine B (ethanol)	552	580	107 000	0,7	74 900	[6]

**Tableau 2.1 : Propriétés spectroscopiques de quelque fluorophores choisis**

### 1.5.6 La photostabilité

Pour la détection de molécule unique, outre la brillance et les autres paramètres dont nous venons de parler, il est indispensable de prendre en compte la photostabilité des molécules qui constitue, en général, le facteur limitant le plus important. La photostabilité traduit le nombre de photons moyen que peut émettre une molécule fluorescente avant d'être dégradée. Typiquement, les fluorophores sont capables d'émettre  $10^5$  photons avant de photoblanchir (cf tableau 2.2<sup>8</sup>). Soumis à un rayonnement d'excitation, les fluorophores dans leur état excité singulet ou triplet peuvent, dans certaines conditions, subir une réaction photochimique

<sup>7</sup>L'acronyme EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) désigne un fluorophore optimisé, dérivé d'une protéine naturellement fluorescente appelée GFP (Green Fluorescent Protein) extraite de la méduse *Aequorea Victoria*. La GFP, comme l'EGFP, émettent dans le vert pour une excitation dans le bleu.

<sup>8</sup>TMR : Tetraméthylrhodamine

irréversible qui empêche le retour de la molécule dans son état excitable<sup>9</sup>. On caractérise ce phénomène par le rendement quantique de photoblanchiment<sup>10</sup>  $\phi_b$  [9] [41]. Ce dernier correspond à l'inverse du nombre de photons moyen émis par une molécule de ce type avant de photoblanchir  $N_{Ph\_emis}$  :

$$\phi_b = \frac{1}{N_{Ph\_emis}} \quad (2.17)$$

La détermination de cette grandeur ne peut être faite avec précision du fait des incertitudes sur les paramètres entrant en jeu. Cependant, on peut l'estimer en réalisant par exemple des mesures relatives par rapport à des molécules modèles telles que la rhodamine.

Fluorophore	Nombre moyen de cycle d'excitation avant photoblanchiment	$\lambda_{excitation}$ (nm)
Coumarin 120	3 000	365
Coumarin 307	6 500	397
Coumarin 102	2 300	397
Coumarin 39	800	397
Carbostyryl 124	700	335
Rhodamine 6G	833 000	515
TMR	3 070 000	515
Rhodamine123	1 570 000	515

**Tableau 2.2 : Photostabilité de quelques fluorophores en solution aqueuse pour une excitation continue de  $10^3 W.cm^2$ [41].**

La fréquence d'occurrence du photoblanchiment dépend fortement des conditions expérimentales (le rendement quantique de photoblanchiment peut varier de quelques  $10^{-7}$  à quelques  $10^{-3}$ ) : environnement, intensité d'excitation [41][7]. Ainsi, le photoblanchiment est

<sup>9</sup>Il est important de préciser que l'irréversibilité d'une photodégradation est définie à l'échelle de l'expérience, il nous est donc impossible de différencier un photoblanchiment définitif d'un autre potentiellement réversible après un temps plus long que la durée de l'expérience. En conséquence, dans la suite du manuscrit, nous considérerons comme photoblanchie toute molécule ne recouvrant pas ses propriétés initiales de fluorescence avant l'issue de l'expérience.

<sup>10</sup>On notera que l'on peut le trouver exprimé sous la forme suivante :  $\phi_b = \frac{\eta_D}{N_d}$  où  $\eta_D$  est l'efficacité de détection (qui englobe l'efficacité quantique du détecteur, la fraction de l'émission collectée par l'angle solide de détection, la transmission du filtre de détection et celle des optiques de collection), et  $N_d$  est le nombre de photons détectés avant photoblanchiment de la molécule.

un phénomène complexe qui peut résulter de réactions de la molécule avec divers acteurs (photo-oxydation par l'oxygène ou par d'autres molécules, photo-ionisation par les photons d'excitation)[23], ou encore de réarrangements métastables de la molécule (encore mal expliqué).

La photooxydation peut survenir, suite à la collision d'un fluorophore dans l'état triplet et d'une molécule d'oxygène qui peut se traduire par la formation d'une molécule d'oxygène singulet. En présence d'oxygène singulet, les fluorophores sont alors susceptibles d'être oxydés pour former une nouvelle molécule non fluorescente. Par ailleurs, ces derniers sont à même de réagir avec d'autres constituants de la matrice dans laquelle ils évoluent, et de donner, soit un composé semi-oxydé, soit un composé semi-réduit [142]. L'ionisation d'un fluorophore préalablement porté dans un état excité (triplet ou singulet) de haute énergie par l'absorption successive de photons, est une autre source possible de photoblanchiment appelée photoionisation. Il en découle que l'utilisation de fortes puissances peut dégrader la photostabilité d'une molécule. Outre l'intensité moyenne d'excitation, le type d'excitation (continue, à impulsions brèves ou plus particulièrement biphotonique), influence la vitesse d'apparition du photoblanchiment. En général, une excitation à deux photons (puissance crête plus grande) sera plus dommageable en termes de photoblanchiment qu'une excitation monophotonique[22][110].

Suivant les conditions expérimentales (vide ou non, concentrations relatives des différents acteurs en présence, mobilité des molécules, puissance d'excitation, etc.), certains phénomènes seront prépondérants. On les choisira donc en vue de minimiser les phénomènes de photo-instabilité. Dans le cas particulier d'une expérience sur des spécimens biologiques fixés, on optera pour des milieux de montage (milieu expérimental) conçus pour ralentir l'apparition des phénomènes de photodégradation ("anti fading" milieu élaboré pour minimiser la présence des radicaux réactifs). Par ailleurs, on travaillera préférentiellement avec une excitation relativement faible et/ou un temps d'acquisition court (tant que faire se peut) en optimisant le système de détection afin de retarder au maximum la photodestruction des molécules.

## 1.6 Quelques marqueurs fluorescents

La grande influence du milieu environnant sur les propriétés de fluorescence des fluorophores, peut être exploitée. Cette aptitude à réagir différemment en fonction de leur entourage en fait d'excellents outils d'analyse photochimique, biochimique et biologique : on parle alors de sondes fluorescentes. Leur domaine d'application est aussi varié que l'étude de polymères (dynamique, stabilité, viscosité...), de solides (nature, polarisabilité, rigidité, porosité...), de surfactants, de membranes biologiques, de vésicules, de protéines, d'acides nucléiques, de cellules vivantes [157]... Ces sondes fluorescentes, utilisées en biologie, peuvent être répertoriées sous trois catégories : les fluorophores intrinsèques, naturellement présents dans la cellule tels que quelque acides aminés, les fluorophores extrinsèques covalents (molécules synthétiques greffées par liaison covalente sur des molécules biologiques), les extrinsèques non-covalents. Cette dernière famille peut englober des fluorophores synthétiques qui ne sont pas de simples molécules mais des nanoparticules (nano-diamants, boîtes quantiques,...) qui présentent une photostabilité accrue.

### 1.6.1 Les fluorophores intrinsèques

Les cellules contiennent des éléments naturellement fluorescents comme certains acides nucléiques et certaines protéines. Les ARNs et ADNs, molécules les plus communes, sont peu fluorescentes. Par contre, les protéines sont pratiquement toutes des fluorophores efficaces du fait de la présence d'acides aminés aromatiques dans leur composition (tryptophane, tyrosine, phénylalanine,...). Elles sont excitables dans l'UV, un rayonnement hautement toxique pour le vivant et photoblanchissent très rapidement. Une molécule de tryptophane émet, en moyenne, moins de 10 photons avant de photoblanchir, ce qui est un inconvénient majeur pour la détection de molécules uniques. Parmi les protéines fluorescentes, on citera également la Green Fluorescent Protein [153], GFP, protéine fluorescente très utilisée. La GFP, issue d'une méduse (l'*Aequorea victoria*), est intrinsèquement fluorescente. De nombreux travaux menés pour améliorer cette protéine (modification des spectres d'absorption et d'émission, compatibilité avec les différents organismes biologiques, amélioration de la stabilité de la molécule) ont conduit à l'élaboration de variantes de la GFP ayant des caractéristiques spectrales modifiées : EGFP (Enhanced GFP), EBFP (Enhanced Blue FP), ECFP (Enhanced Cyan FP),

EYFP (Enhanced Yellow FP), absorbant respectivement autour de 488, 380, 433, 515 nm et émettant respectivement autour de 509, 440, 476, 529 nm. Les séquences ADN codant pour ces protéines peuvent être incorporées spécifiquement au génome des spécimens étudiés pour qu'elles soient synthétisées dans certains types de cellules. Sa large compatibilité couplée à ses propriétés spectrales et à sa photostabilité en font un outil de choix pour les biologistes. Une autre famille de molécules extrêmement intéressantes est celle des flavines, telles que la FAD (flavinadeninucleotide) et les NAD(P)H (nicotinamide adeninucleotide (phosphate)). Ce sont des dérivés d'acides nucléiques dont le rôle est de transporter les électrons dans la cellule. Elles possèdent toutes les deux des propriétés oxydo-réductrices, qui en font des co-enzymes de très nombreuses réactions d'oxydoréduction se produisant dans les cellules. Ces mêmes propriétés en font des fluorophores intéressants puisque seule l'une de leurs formes, oxydée ou réduite, est fluorescente. De plus, les flavines et les NAD(P)H émettent dans le visible. Elles absorbent respectivement entre 450 nm et 490 nm, et aux environs de 360 nm et émettent entre 500 et 560 nm et aux environs de 460 nm, avec un décalage vers le bleu d'une vingtaine de nanomètres lorsque les NAD(P)H sont liées à des protéines. Ces molécules sont surtout utilisées en imagerie de fluorescence afin, par exemple, de suivre le métabolisme de tissus vivants ou pour différencier certains types de cellules. Malheureusement leur faible photostabilité constitue un facteur très limitant. Le tableau 2.3 liste quelques fluorophores intrinsèques, et indique les maxima d'absorption et d'émission correspondant.

Fluorophores	$\lambda_{absorption}(nm)$	$\lambda_{émission}(nm)$	commentaires
<i>Acides nucléiques</i>			
Adénine	260	321	Très peu fluorescent
Guanine	255	329	
Cytosine	270	313	
Thymine/Uracile	270/260	320/308	
<i>Protéines</i>			
Tryptophane	280	348	sensible au pH
Tyrosine	275	303	sensible au pH
Phénylalanine	257	282	
<i>Hèmes, .coenzymes, .</i>			
NADH, NADPH	340	470	
Hème (protoporphyrine)	400	608	
<i>GFP (dérivés de la green Fluorescent protein)</i>			
EGFP(enanced green FP)	480	580	Très efficaces
ECFP(enanced cyan FP)	425	475	

Tableau 2.3 : quelques fluorophores intrinsèques

### 1.6.2 Les fluorophores extrinsèques

Peu de molécules naturelles sont fluorescentes. Pour y remédier, on peut marquer avec des fluorophores les molécules non fluorescentes (ou pas assez fluorescentes) auxquelles on s'intéresse pour leur rôle dans un processus donné, ou pour leurs propriétés de sonde dans une expérience donnée. Le marquage fluorescent consiste à rendre "visible" l'objet que l'on souhaite étudier ou utiliser pour étudier certains processus, en le reliant à un ou plusieurs fluorophores par le biais de différents moyens (précurseurs biologiques, liaisons covalentes, liaisons hydrogènes, réactions enzymatiques,...). On fait appel à ces procédés dans la majeure partie des expériences, cependant on distinguera deux catégories :

(i) Les expériences visant à visualiser, cartographier, ou suivre certaines molécules. Pour ce genre d'applications, on utilisera typiquement des colorants lasers comme la rhodamine, le Nile blue, la fluorescéine (cf. Figure 9), des fluorophores synthétiques (boîtes quantiques

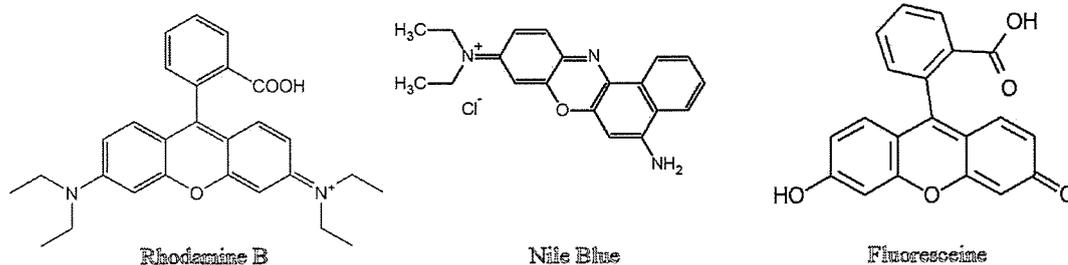


FIG. 9 – Structure développée de quelques colorants lasers

(quantum dots)[26][15] ou encore nano-diamants [171][47]), et pour les applications biologiques des fluorophores tolérés par la cellule (alexa, cyanines, DiI, GFP,...). La fonctionnalisation des fluorophores synthétiques, boîtes quantiques ou des nano-diamants, est un enjeu important qui fait l'objet de recherches actives. Les boîtes quantiques, commercialement appelées "Quantum Dots", sont des nanocristaux semi-conducteurs de dimensions nanométriques. Les nanoparticules de diamant sont, quant à elles, des fluorophores fonctionnant grâce à l'insertion d'impuretés (azote) et de lacunes dans la matrice des nanocristaux : c'est ce qu'on appelle les centres colorés N-V du diamant. Ces nanoparticules présentent toutes deux des propriétés de fluorescence ajustables par le contrôle de leur diamètre. Ces fluorophores artificiels sont parfaitement photostables à température ambiante et présentent une efficacité de fluorescence en général plus grande que les fluorophores classiques. Elles peuvent également être fonctionnalisées de sorte à marquer des protéines ou à reconnaître certains sites biologiques via des anticorps secondaires recouvrant leur paroi extérieure. Toutefois, la taille et les difficultés de vectorisation des nanoparticules (il est très délicat de les insérer dans les cellules ou les compartiments voulus) font que dans de nombreuses applications, on utilise encore des fluorophores moléculaires tel que les Cyanines, l'Alexa et surtout la GFP et ses dérivés.

(ii) Les expériences utilisant le fluorophore comme sonde de son environnement. Dans ce cas le fluorophore est l'outil de l'étude et non l'objet de celle-ci. Là encore, on utilisera des colorants lasers (pérylène orange pour étudier les films sol gels par exemple [67]) ou des molécules sondes fonctionnalisées, marquées pour les rendre fluorescentes (type chélateurs comme l'Oregon Green Bapta-5N, que j'ai utilisé au cours de ma thèse).

Les fluorophores extrinsèques utilisés en tant que sondes sont, pour beaucoup, mis au point dans l'optique de détecter la présence de composants chimiques ou biologiques tels que les cations ( $N^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , ...), les anions (citrate, carboxylates, phosphate, ATP, ADN, ARN, ...), les molécules neutres (sucres comme le glucose par exemple), les gaz ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NO$ , ...). Ainsi, ils permettent le développement de capteurs biologiques ou chimiques détectables optiquement via des techniques le plus souvent très peu voire non intrusives. Le complexe formé par un (ou plusieurs) fluorophore(s) et sa(leur) cible ne présente pas les mêmes propriétés de fluorescence que le fluorophore seul. Plus précisément, la formation d'un complexe (stable ou régi par un équilibre dynamique) peut se traduire, pour une sonde initialement non fluorescente (ou peu fluorescente), par une augmentation notable du rendement quantique de fluorescence (ou respectivement par une diminution du rendement quantique pour une sonde initialement fluorescente) ou bien encore par un décalage spectral de l'émission de fluorescence[98].

## **2 Intérêts et difficultés d'une détection à l'échelle de la molécule unique.**

De nos jours, la détection optique de molécules uniques (nous ne nous intéresserons qu'aux méthodes optiques) est une approche largement employée aussi bien en physique qu'en biologie ou en chimie. La variété des techniques utilisées pour de telles expériences est grande [78][99][165][78]. On pourra distinguer, d'une part, les méthodes d'imageries faisant appel à des outils comme les microscopes confocaux, de grand champ ou de champ proche, et d'autre part, celles d'investigations spectroscopiques, s'appuyant également, le plus souvent, sur des systèmes de collection types microscopes confocaux à très faible bruit de détection. L'imagerie de molécule unique permet, par exemple, de remonter au temps de vie de fluorescence par FLIM (Fluorescence Life Time Imaging) [152], d'accéder aux conformations des molécules grâce au FRET (Fröster Energy Transfert) [19], d'étudier la mobilité de particules via des procédés de « tracking » [48][59]. Les techniques d'analyse spectrale et de FCS (Fluorescent Correlation Spectroscopie), quant à elles, fournissent, entre autres, un outil d'étude de l'impact de l'environnement direct des molécules sur leurs propriétés d'émission et d'absorption,

des variations de conformation et d'orientation des molécules, ou encore un moyen de suivre des dynamiques réactionnelles. Très souvent, la spectroscopie et l'imagerie sont couplées afin d'obtenir un maximum d'informations.

Je vais consacrer cette partie à expliquer l'intérêt des études à l'échelle de la molécule unique mais également les difficultés et pièges à éviter.

## 2.1 Les apports vis-à-vis des techniques macroscopiques

Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les molécules sont des sondes de leur environnement. Une expérience à l'échelle de nombreuses molécules identiques, physiquement et chimiquement, fournit une réponse moyenne qui masque les effets d'inhomogénéités locales du milieu. Un des intérêts d'une étude à l'échelle de la molécule unique est qu'elle permet de s'affranchir totalement des effets de moyennes. En effet, lorsque l'on observe les comportements de molécules en milieu très dilué (de l'ordre de  $10^{-9}$  ou  $10^{-10}$  M dans les cas d'un milieu liquide) on peut remonter, en limitant suffisamment le volume sondé (typiquement à quelques  $\mu m^3$ ), à un grand nombre d'informations concernant la molécule ainsi que le milieu dans lequel elle est plongée. La spectroscopie de molécule unique rend notamment possible la mesure des spectres optiques, en absence d'élargissement inhomogène dû aux variations d'environnement perçues par chacun des individus. Non seulement on accède à la nature et à la structure des transitions, mais aussi aux conformations sous-jacentes de la molécule qui provoquent l'élargissement spectral à l'échelle des populations macroscopiques. Le caractère de sonde locale des molécules offre également l'opportunité de remonter aux paramètres microscopiques définissant un matériau. Pour illustrer ceci, on peut citer comme exemple l'approche spectroscopique et microscopique de l'étude de film solgels à l'échelle de la molécule unique effectuée par Carine Julien au cours de sa thèse [67] (ou tout autre matériau amorphe). Celle-ci a permis d'accéder au degré d'hétérogénéité locale de la matrice en observant les traces temporelles d'émission de fluorescence des molécules (clignotement, photoblanchiment, durée de vie), mais aussi en étudiant les spectres d'émission (diffusion spectrale corrélée aux reconfigurations locales de la matrice, ou aux changements des caractéristiques photophysiques de la molécule sonde).

Pour une étude en molécules uniques, on ne s'intéresse qu'à un seul individu à la fois,

on peut donc observer son comportement lorsqu'il est isolé de la masse et, par là même, remonter aux différents événements auxquels il prend part, sans besoin de synchroniser leur déclenchement. Ceci constitue un intérêt majeur de la molécule unique. En effet, l'étude de dynamiques séquentielles du type processus de complexation (comme j'ai pu le faire au cours de ma thèse) ou polymérisation linéaire, ne peut, à l'échelle macroscopique, fournir de résultat probant du fait de la désynchronisation des réactions à l'échelle moléculaire. Des lors qu'un déclenchement synchrone n'est pas réalisable, ce qui est souvent vrai, particulièrement lorsque des étapes ou des intermédiaires sont impliquées dans le déroulement du processus (par exemple dans le cas d'une réaction enzymatique), la dynamique détaillée des processus est perdue. Pour appuyer ceci, on peut citer les travaux récents de S. Xie et al. [97][43] sur les fluctuations enzymatiques. Confortés par des études théoriques et informatiques, ils ont démontré la puissance de l'approche de molécule unique pour remonter aux dynamiques enzymatiques et aux variations de conformations. En utilisant des techniques de corrélation de fluorescence, de comptage de photons uniques et de mesure de temps de vie, ils ont fourni une vision non seulement qualitative sur l'impact des fluctuations de conformation des enzymes sur l'activité catalytique, mais aussi quantitative (taux de décroissance de fluorescence, échelle temporelle des fluctuations) sur les dynamiques enzymatiques dont les fluctuations s'étalent sur une très large gamme temporelle.

D'un point de vue des études biologiques [128], un des intérêts majeurs d'utiliser un très petit nombre de molécules, est la réduction notable des perturbations imposées au système. Ainsi, pour les expériences visant à l'étude du vivant, le risque de modifier le comportement de la cellule, en y introduisant des corps étrangers, est nettement diminué. Il est désormais possible de visualiser le comportement dynamique et la cinétique de réaction de molécules biologiques individuelles à l'intérieur des cellules vivantes. L'imagerie de molécule unique constitue un moyen direct, peu voire non invasif, d'évaluer quantitativement, avec une haute résolution spatiale et temporelle, des événements biologiques à l'intérieur des cellules.

Enfin, combinée avec la microscopie de champ proche (technique sur laquelle je ne m'attarderai pas) et plus précisément la microscopie de balayage à sonde locale (SPM), la microscopie de molécule unique permet la mesure des propriétés mécaniques ou électriques de molécules simples : forces de liaisons, moment de torsion, conductibilité, etc.

Bien sûr, le prix à payer lorsque l'on travaille à l'échelle de la molécule unique est que

l'on observe des phénomènes isolés et parfois même des spécimens exotiques. Il est donc extrêmement important de se garder de généraliser les propriétés d'une sous-population donnée à toute une population macroscopique de molécules. La molécule unique est donc loin de constituer une technique permettant d'obtenir une statistique significative semblable à celle produite par une population macroscopique de molécules, mais par contre, comme nous venons de le voir, donne accès à bien d'autres informations de valeur. De ce fait, on saisit bien l'intérêt de pouvoir concilier les deux approches afin de prévenir toute conclusion hâtive.

## 2.2 Signal et bruit de fond

### 2.2.1 Le signal utile

Le revers de cette technique est la faible intensité du signal à détecter en comparaison avec celui que fournirait toute une population de molécules. Il est indispensable que le signal émis par la molécule servant de nanosonde soit dominant par rapport aux signaux de diffusion émis par toutes les autres molécules du milieu d'étude et par rapport aux signaux parasites provenant du système de détection. Il est donc nécessaire de maximiser le signal utile et de diminuer les sources de bruit. Dans ce paragraphe, nous allons évaluer le signal utile émis par une nanosonde.

En considérant un système de détection présentant une efficacité de détection  $\eta_D$ , le signal utile détecté se définit comme suit :

$$S_f^{1ph} = \eta_D \phi_f \sigma_{a0} \frac{1}{1 + \frac{I}{I_S}} \frac{I}{h\nu} \tau_{Acq} \quad (2.18)$$

Il dépend du temps d'acquisition  $\tau_{Acq}$ , de l'efficacité de détection, qui peut atteindre 1 à 15% dans des montages optimisés pour la détection de molécules uniques, de l'intensité d'excitation  $I$  et de saturation  $I_S$ , des performances du système molécule fluorescente / milieu, via l'efficacité de fluorescence  $\phi_f$ , et également de la section efficace d'absorption  $\sigma_{a0}$ , et de la fréquence d'excitation  $\nu$ .

Aux vues de l'expression 2.18, il apparaît clairement que les critères de sélection des fluorophores énoncés dans les paragraphes précédents, efficacité de fluorescence  $\phi_f$ , section efficace d'absorption  $\sigma_{a0}$ , intensité de saturation  $I_S$ , présentent une importance primordiale

vis-à-vis du signal de fluorescence. Cette relation fait également ressortir l'influence de la photostabilité du fluorophore. Suivant le système choisi et les conditions d'excitation, elle peut constituer le paramètre limitant concernant le choix du temps d'acquisition  $\tau_{Acq}$ . Lors de ce choix, si la photostabilité n'est pas prise en compte, la photodégradation peut survenir avant la fin de l'expérience et, en conséquence, conduire à une mauvaise interprétation des résultats. Par ailleurs, afin d'augmenter le signal de fluorescence, on optera pour une intensité excitatrice  $I$  proche de l'intensité de saturation  $I_S$ . On notera dès à présent que l'intensité influence également le signal parasite. De ce fait, comme nous allons le voir dans les paragraphes qui vont suivre, on devra chercher le meilleur compromis entre l'intensité du signal utile et le niveau de bruit. Le rôle du système de détection, via le paramètre  $\eta_D$ , apparaît lui aussi comme critique si l'on souhaite optimiser au maximum le signal utile.

Nous venons de voir comment maximiser le signal utile, voyons à présent comment minimiser le bruit et les signaux parasites.

### 2.2.2 La problématique du bruit de fond

Le bruit peut être d'origines très variées. Les sources majeures sont le bruit de diffusion de la matrice et celui provenant de la détection, auxquels peuvent s'ajouter un bruit technique lié à l'optique et au dispositif expérimental. Ce dernier peut résulter de la fluorescence résiduelle provenant des éléments optiques du montage, en particulier des filtres ou de l'objectif de microscope, mais également de l'existence d'un fond de fluorescence de la source d'excitation. Il est possible de limiter le bruit issu du montage par l'utilisation d'un filtre d'excitation adapté.

Concernant les photons provenant de l'échantillon, le problème est plus complexe. Ils peuvent être de trois types : issus de la diffusion Rayleigh élastique engendrée par les photons d'excitation, issus de la diffusion Raman de la matrice, ou encore générés par la fluorescence intrinsèque du milieu d'étude. Le bruit de diffusion induit par un milieu constitué de  $n$  molécules par unité de volume, pour une excitation à un photon, s'écrit :

$$\begin{aligned}
 B_{diff} &= C_b \cdot \eta_D \cdot \frac{I_{ex}}{h\nu} \tau_{acq} \\
 &= \left[ n \cdot (f_{Raman} \sigma_{Raman} + f_{Rayley} \cdot \sigma_{Rayley}) + \sum_i n_i \cdot f_i \cdot \phi_i \cdot \sigma_{ai} \right] \eta_D \cdot V \cdot \frac{I_{ex}}{h\nu} \tau_{acq}
 \end{aligned} \tag{2.19}$$

Où  $\sigma_{Raman}$  est la section efficace de diffusion Raman des molécules du milieu (de l'ordre de  $10^{-30}cm^2$  pour une matrice peu diffusante à  $10^{-28}cm^2$  pour un milieu très diffusant), et  $\sigma_{Rayley}$  la section efficace de diffusion Rayleigh (de l'ordre de  $10^{-20}cm^2/molécule$ ). On pourra comparer ces grandeurs à celle de la section efficace d'absorption d'un bon fluorophore que l'on peut évaluer, pour une excitation modérée, comme étant de l'ordre de  $10^{-16}cm^2$ . Le second terme entre crochet correspond à la somme des contributions des différentes espèces autofluorescentes,  $i$ , présentes dans l'échantillon, et fait intervenir les paramètres  $n_i$ ,  $\phi_i$ ,  $\sigma_{a_i}$  qui se rapportent respectivement au nombre de molécules,  $i$ , par unité de volume, à l'efficacité de fluorescence et à la section efficace d'absorption de l'espèce  $i$ . Les termes  $f_{Raman}$ ,  $f_{Rayley}$ ,  $f_i$ , quant à eux, correspondent à l'atténuation par filtrage spectral ou temporel des signaux Raman, Rayleigh et d'autofluorescence.

Le bruit de diffusion Rayleigh, souvent intense dans les expériences de spectroscopie optique, peut être très atténué par l'utilisation de filtres d'excitation et de détection. On traduit cette atténuation dans l'expression 2.19 par le terme  $f_{Rayley}$ . La diffusion Raman étant un phénomène beaucoup plus rapide que l'émission de fluorescence, on peut s'en affranchir en partie par filtrage temporel. L'impact de l'autofluorescence, quant à lui, peut être d'ampleur différente suivant l'expérience considérée. Il peut très souvent être négligé, voire nul, comme pour des études de molécules in vitro ou dans des matériaux non fluorescents. Il est cependant indispensable d'en tenir compte dans le cadre d'expériences biologiques in vivo qui, comme nous avons pu le voir en étudiant les différents types de fluorophores existants, peuvent créer un signal parasite d'autofluorescence très néfaste en particulier en détection de molécules uniques. On peut donner un ordre de grandeur de l'efficacité de fluorescence des molécules autofluorescentes à comparer à celle d'un bon fluorophore que l'on considèrera comme étant de l'ordre de 0,8. Celle-ci va classiquement de quelques  $10^{-4}$  pour les acides nucléiques à 0,2 pour les protéines comme le tryptophane. Il est possible de limiter cette source de bruit en choisissant un fluorophore et la source d'excitation associée de sorte à se placer dans la zone spectrale où l'autofluorescence est la plus faible. Comme pour la diffusion Rayleigh, on utilisera des filtres d'excitation et de détection à bande étroite centrés sur la longueur d'onde excitatrice et sur la longueur d'onde d'émission du fluorophore auquel on s'intéresse. Les filtres de fluorescence peuvent fournir, dans la zone d'intérêt, une efficacité de transmission de l'ordre de 90% sur des bandes spectrales de 30nm de large et, de part et d'autre de cette

zone, la transmission peut être réduite, sur une large bande spectrale, à des valeurs comprises entre  $10^{-3}$  et  $10^{-6}$ .

Le signal parasite provenant du détecteur se divise, quant à lui, en deux. D'une part le décalage ("offset") présent chez certains détecteurs comme les CCD qui correspond à un fond constant (qu'on soustrait facilement), et d'autre part le bruit noir du détecteur, qui, lui, augmente linéairement avec le temps d'acquisition,  $N_D \tau_{acq}$ . En général, on peut négliger cette source par rapport aux autres provenant de l'échantillon.

On peut écrire le rapport signal sur bruit, pour une excitation monophotonique [10][100], comme suit :

$$\frac{S_f}{B} = \frac{S_f}{\sqrt{S_f + N_D \tau_{acq} + B_{diff}}} \quad (2.20(a))$$

Si on néglige le bruit noir du détecteur, cette expression peut s'écrire [28] :

$$\frac{S_f}{B} = \frac{\sqrt{\eta_D \phi_f \sigma_{a0} \frac{I}{h\nu} \tau_{Acq}}}{\sqrt{\left(1 + \frac{I}{I_s}\right) \left(1 + \left(1 + \frac{I}{I_s}\right) \cdot \frac{C_b}{\phi_f \sigma_{a0}}\right)}} \quad (2.20(b))$$

Avec  $C_b = V.n. \left[ (f_{Raman} \sigma_{Raman} + f_{Rayley} \cdot \sigma_{Rayley}) + \sum_i n_i \cdot f_i \cdot \phi_i \sigma_{a_i} \right]$

Il apparait clairement dans l'expression ci-dessus qu'afin d'optimiser le rapport signal sur bruit, il faut d'une part optimiser le numérateur en choisissant le meilleur système fluorophore-matrice-détection comme nous l'avons vu au paragraphe précédent et, d'autre part, minimiser le dénominateur. On peut montrer que lorsque l'intensité d'excitation  $I$  devient très supérieure à l'intensité de saturation  $I_s$  le rapport signal sur bruit chute. Comme nous l'avons conclu précédemment on choisira donc de travailler légèrement en dessous de l'intensité de saturation. Par ailleurs, on se placera de préférence dans une région du spectre où l'autofluorescence est faible, et dans un milieu peu diffusant. De plus, on choisira un jeu de filtres bien adaptés spectralement, c'est-à-dire, présentant une grande transmission dans la zone d'intérêt, afin de ne pas limiter l'efficacité de détection et une bonne efficacité d'extinction pour les autres longueurs d'onde, de sorte à éliminer un maximum de bruit. Enfin, pour diminuer les signaux parasites proportionnels au volume sondé  $V$  et donc d'améliorer le rapport signal sur bruit, on tachera de le limiter autant que possible. La réduction du volume sondé s'obtient, en microscopie confocale, en diminuant le volume focal d'excitation, et, en

microscopie "grand champ", en limitant l'épaisseur des échantillons étudiés.

Si on considère le cas suivant : - un système optique optimisé tel que  $\eta_D = 0,10$  - un bon fluorophore  $\phi_f = 0,9$ ,  $\sigma_{a_0} = 10^{-16} \text{cm}^2$  et  $I_s = 20 \text{kWcm}^{-2}$  - les contributions de la diffusion à la longueur d'onde d'intérêt  $f_{Raman}\sigma_{Raman} = 10^{-30}$ ,  $f_{Rayley}\sigma_{Rayley} = 10^{-20}$  - un volume d'étude  $V = 35 \text{fL}$  - une concentration en molécules fluorescentes de  $10^{-8} \text{M}$  - une intensité d'excitation à  $\lambda = 488 \text{nm}$  égale à l'intensité de saturation  $I_s$  -, on peut évaluer le rapport signal sur bruit, en absence d'auto fluorescence à environ 68%. Si par contre on augmente l'intensité d'excitation jusqu'à  $400 \text{kW.cm}^{-2}$ , cette valeur chute à 35%.

### 2.2.3 Le cas de l'absorption à deux photons

#### Le signal de fluorescence à deux photons

L'absorption à deux photons est un phénomène du second ordre. L'expression du nombre de photons absorbés par molécule et par unité de temps  $N_{abs}(t)$  dépend du volume sondé  $V$ , de la section efficace d'absorption à deux photons  $\sigma^{2ph}$ , de la concentration de fluorophore  $C$  (en  $\text{cm}^3$ ) et du carré de l'intensité excitatrice, telle que [167] :

$$N_{abs}(t, I) = \int_V \sigma_a^{2ph} C(r, t) \frac{I^2(r, t)}{(h\nu)^2} dV \quad (2.21)$$

La dépendance en  $I^2$  reflète le fait que l'excitation biphotonique implique l'absorption de deux photons. Si on considère la section efficace d'absorption  $\sigma^{2ph}$  homogène sur tout le volume  $V$ , on peut sortir ce terme de l'intégrale.

En considérant l'absence d'émission stimulée et d'auto-inhibition de la fluorescence, le signal de fluorescence collecté pour un temps d'acquisition  $\tau_{Acq}$  s'écrit :

$$S_f^{2ph}(t) = \frac{1}{2} \phi_f \eta \sigma_a^{2ph} \int_V C(r, t) \frac{I^2(r, t)}{(h\nu)^2} dV \tau_{Acq} \quad (2.22)$$

Avec  $\eta$  l'efficacité de collection et  $\phi_f$  le rendement quantique de fluorescence.

En pratique, on mesure une moyenne temporelle de ce signal. Si on considère une excitation avec un taux de répétition  $f$  et une largeur totale à mi hauteur  $\tau$ , dans l'approximation paraxiale et pour un échantillon beaucoup plus épais que la profondeur de champ, on peut estimer correctement le signal moyen de fluorescence en utilisant l'expression suivante [167][3] :

$$\langle S_f^{2ph}(t) \rangle = \frac{1}{2} \phi_f \eta C \sigma_a^{2ph} \left\langle \frac{I_0(t)}{(h\nu)} \right\rangle^2 \frac{g_p}{f\tau} \frac{8n\lambda^3}{\pi^3 (NA)^4} = \frac{1}{2} \phi_f \eta C \sigma_a^{2ph} \frac{g_p}{f\tau} \frac{8n \langle P(t) \rangle^2}{\pi\lambda} \quad (2.23)$$

Où  $NA$  est l'ouverture numérique du système.

Pour ce faire, il faut introduire le terme  $g$  correspondant à la cohérence temporelle de l'excitation :  $g = \frac{\langle I_0^2(t) \rangle}{\langle I_0(t) \rangle^2} = \frac{g_p}{f\tau}$ , avec  $g_p$  paramètre sans dimension qui traduit la forme de l'impulsion et tel que, pour une impulsion gaussienne,  $g_p = 0,664$ .

À deux photons, le signal utile dépendra donc du carré de l'intensité, mais également de la forme de l'impulsion excitatrice. Comme à un photon, il faudra choisir scrupuleusement le fluorophore en fonction de son efficacité de fluorescence  $\phi_f$ , de sa section efficace d'absorption  $\sigma_a^{2ph}$ . On notera que celle-ci est nettement inférieure à celle correspondant à une excitation monophotonique. En général, on trouve des valeurs de l'ordre de 1 à 10 GM (pour un bon fluorophore), ou GM signifie Gopper Mayer et  $1GM = 10^{-50} \text{cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{photon}^{-1}$ . On peut estimer que le rapport  $\sigma_a^{1ph} / \sigma_a^{2ph}$  est généralement compris  $10^{-32}$  et  $10^{-34} \text{cm}^2 \cdot \text{s} / \text{photons}$  [166]. Ceci étant dit, on comprend bien que, pour obtenir un signal d'intensité comparable à un et deux photons, il faudra augmenter l'intensité d'excitation, mais également, comme pour une excitation monophotonique, optimiser au maximum la détection et choisir un temps d'acquisition suffisant.

### Le rapport signal sur bruit à deux photons

Les sources de bruit à prendre en considération lors d'une expérience de spectroscopie ou microscopie à deux photons sont, elles aussi, différentes. Tout d'abord, l'écart spectral entre l'excitation et l'émission de fluorescence est telle, que l'on pourra éliminer les signaux de diffusion Raman et Rayleigh via l'utilisation de filtres de détection. Dans de telles expériences, ces derniers ne contribuent donc pas au bruit de fond, cependant, il est indispensable de tenir compte de la diffusion hyper-Rayleigh et hyper-Raman, dont les contributions respectives sont désormais non négligeables. L'expression 2.19 du bruit de diffusion à un photon, dans

un milieu sans autofluorescence, devient alors, pour une excitation biphotonique :

$$\begin{aligned} B_{diff}^{2ph} &= \frac{1}{2} \eta_D C_b^{2ph} \cdot \tau_{acq} \int_V C(r, t) \frac{I^2(r, t)}{(h\nu)^2} dV \\ &= \frac{1}{2} n \cdot \eta_D \cdot V \cdot (\sigma_{hyperRaman} + f \cdot \sigma_{hyperRayley}) \tau_{acq} \int_V C(r, t) \frac{I^2(r, t)}{(h\nu)^2} dV \end{aligned} \quad (2.24)$$

où  $\sigma_{hyperRaman}$  et  $\sigma_{hyperRayley}$  sont respectivement les sections efficaces de diffusion hyper Raman et hyper Rayleigh du milieu expérimental. On les évalue, en solution filtrée d'eau dé-ionisée à 840 nm, pour la diffusion hyper-Raman à environs  $7 \cdot 10^{-63} cm^4 \cdot s / photon / molécule$  et pour la diffusion hyper-Rayleigh à environs  $8 \cdot 10^{-62} cm^4 \cdot s / photon / molécule$  [166]. On néglige dans cette expression le signal d'autofluorescence parasite qui est généralement très faible dans les gammes de longueurs d'onde (typiquement Proche IR) les plus couramment utilisées pour une excitation biphotonique.

Le rapport signal sur bruit, quant à lui, devient :

$$\frac{S_f}{B} = \frac{S_f^{2ph}}{\sqrt{S_f^{2ph} + N_D \tau_{acq} + \frac{1}{2} C_b^{2ph} \cdot \tau_{acq} \int_V C(r, t) \frac{I^2(r, t)}{(h\nu)^2} dV}} \quad (2.25(a))$$

Et, là encore, si on néglige le bruit noir du détecteur, l'expression 2.25(a) peut être écrite comme suit :

$$\frac{S_f}{B} = \frac{\sqrt{\frac{1}{2} \phi_f \eta \sigma_a^{2ph} \int_V C(r, t) \frac{I^2(r, t)}{(h\nu)^2} dV \tau_{Acq}}}{\sqrt{1 + n \cdot V \cdot \frac{(\sigma_{hyperRaman} + f \cdot \sigma_{hyperRayley})}{\sigma_{fluor}^{2ph}}}} \quad (2.25(b))$$

où  $\sigma_{fluor}^{2ph} = \phi_f \sigma_a^{2ph}$  correspond à la section efficace de fluorescence à deux photons.

Les sections efficaces de diffusions étant plus faibles qu'à un photon, pour un niveau de signal utile donné, on n'aura donc un meilleur rapport signal sur bruit en travaillant avec une excitation biphotonique. Cependant, on gardera à l'esprit qu'étant donné la puissance crête nécessaire à l'absorption biphotonique, la photostabilité à deux photons est généralement inférieure à celle que l'on peut avoir à un photon. La conséquence directe de ce phénomène est un temps d'acquisition limité et donc un rapport signal sur bruit diminué. Comme pour

le cas à un photon, l'optimisation du rapport signal sur bruit repose sur un certain nombre de points. Il passe par le choix d'un bon système fluorophore-milieu expérimental, par l'utilisation d'un système de détection optimisé, par un temps d'acquisition suffisamment long dans la gamme temporelle de photostabilité du fluorophore. Il requiert également l'utilisation d'une intensité de travail assez forte pour permettre au processus d'absorption biphotonique de survenir efficacement, mais pas exagérément afin d'éviter l'apparition de phénomènes non linéaires d'ordre supérieur ainsi que la dégradation des échantillons. Enfin, l'importance du volume focal  $V$  apparaît, elle aussi, dans l'expression 2.25(b), et, là encore, un volume raisonnablement petit se traduira par un meilleur rapport signal sur bruit que pour un grand volume. On notera qu'à deux photons le volume focal est défini par le volume d'excitation efficace qui, comme nous allons le voir au paragraphe 3.4, est naturellement faible.

### 3 Les techniques de microscopie optique en champ lointain.

Au cours de ma thèse j'ai été amenée à mettre en œuvre plusieurs techniques de microscopie en champ lointain, à savoir la microscopie grand champ de fluorescence ou en lumière blanche, la microscopie confocale de fluorescence et la microscopie de fluorescence à deux photons. L'objet de cette partie est d'introduire au lecteur les principes de base de ces microscopies ainsi que leurs intérêts respectifs afin de justifier le choix des techniques que j'ai utilisées [138][112].

On se restreindra essentiellement à la microscopie numérique de fluorescence (microscopie qui fait appel à un système électronique d'acquisition permettant à l'utilisateur de visualiser l'image numérisée, à l'opposé de la microscopie optique classique qui forme l'image directement sur l'œil de l'expérimentateur), mais j'ouvrirai une brève parenthèse sur les techniques d'imagerie en lumière blanche auxquelles j'ai fait appel au cours de ma thèse.

Avant d'étudier une à une les différentes techniques de microscopie, je vais commencer par une introduction sur le système pivot de tout microscope : l'objectif.

### 3.1 L'objectif de microscope

On différencie classiquement les objectifs par le biais de quatre caractéristiques : le grandissement, l'ouverture numérique, le contraste et le degré de correction des aberrations. On peut également y ajouter, dans le cas de l'imagerie en lumière blanche, la présence éventuelle de modifications permettant de visualiser des objets de phase.

Nous allons à présent considérer uniquement le cas des objectifs récents, fabriqués pour fonctionner à l'infini (pour lesquels l'image de tout point du plan objet, par l'objectif, se verra renvoyée à l'infini). De plus, nous nous placerons dans le cadre d'une détection de lumière incohérente, c'est-à-dire que le degré de cohérence entre la lumière émise par deux points distincts de l'échantillon sera très faible et, de ce fait, ne générera pas ou peu d'interférences sur l'image obtenue.

Dans ce cas, le grandissement correspond au rapport entre la taille réelle de l'objet à imager et celle de l'image obtenue en sortie du système objectif/lentille de tube<sup>11</sup>. Ce qui nous amène à la remarque suivante : la valeur de grandissement figurant sur les objectifs de microscope correspond au grandissement du système objectif plus lentille de tube, dont la focale  $f$  est spécifiée par le constructeur (pour les objectifs Nikon et Leica  $f=200\text{mm}$ ).

La résolution d'un objectif de microscope est liée, dans les conditions optimales (c'est-à-dire que, sur tout le trajet de collection, le faisceau est uniquement limité par l'ouverture de l'objectif), à la longueur d'onde de travail et à son ouverture numérique  $NA$ <sup>12</sup>, qui représente la quantité :

$$NA = n. \sin \alpha \quad (2.26)$$

où  $n$  est l'indice de réfraction entre l'objectif et l'objet et  $\alpha$  le demi angle d'ouverture au sommet de l'objectif.

On différenciera la résolution latérale  $r_{xy}$ , ou pouvoir séparateur de l'objectif, de la résolution axiale  $r_z$  ou profondeur de champ. La résolution latérale représente la distance minimale entre deux objets ponctuels du plan focal objet, dont le microscope donne deux images séparables. Selon le critère de Rayleigh, valable pour un système considéré comme parfait (limité

<sup>11</sup>La lentille de tube correspond à la lentille ou au système optique permettant de faire l'image de l'objet renvoyé à l'infini par l'objectif sur le détecteur.

<sup>12</sup>Concernant la résolution du microscope, si le faisceau est diaphragmé après l'objectif, il faut considérer l'ouverture numérique associée à l'optique correspondante, et non celle de l'objectif qui dans ce cas n'est plus l'élément limitant.

par la diffraction), illuminé uniformément par une onde plane monochromatique, deux images A' et B' correspondant à deux points A et B seront considérées comme distinctes si le sommet de la tache de diffraction<sup>13</sup> de l'une correspond au premier minimum nul de l'autre. La résolution axiale, quant à elle, peut être définie de façon différente en microscopie confocale ou grand champ. En microscopie confocale, la résolution latérale  $r_{xy}$  se rapporte à la largeur à mi-hauteur du profil d'intensité le long de l'axe Z. Ainsi, la façon la plus courante de mesurer la résolution axiale consiste à considérer la décroissance en intensité le long de l'axe Z pour un objet idéalement ponctuel. En microscopie grand champ, on parlera plus volontiers de profondeur de champ. Cette dernière correspond à l'épaisseur de l'échantillon sur laquelle le signal sera collecté par l'objectif, et donc qui contribuera à l'obtention d'une image. Suivant le critère de Rayleigh, on exprime ces grandeurs comme suit :

$$r_{xy} = \frac{0.61\lambda}{NA} \text{ et } r_z = \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.27)$$

La résolution dépend, outre les paramètres figurants dans l'équation 2.27, de la cohérence<sup>14</sup> de l'illumination, du type d'échantillon et surtout de la présence d'aberrations dans le système optique. On peut s'affranchir en grande partie de ces dernières grâce à certains objectifs de microscope conçus de sorte à éliminer certaines aberrations spécifiques. Afin de corriger la courbure de champ (ou courbure de Petzval), la coma et l'astigmatisme, on utilisera un objectif dit aplanétique ou plan. Pour ce qui est de l'aberration chromatique, on pourra choisir un objectif achromatique qui corrige l'aberration au premier ordre (repliement du spectre pour superposer les foyers bleus et rouges) ou apochromatique pour une correction du chromatisme axial au second ordre (superposition des foyers rouges, verts et bleus). Enfin l'aberration sphérique introduite par l'inadaptation d'indice entre le spécimen, la lamelle ou le milieu d'immersion par rapport à ceux prévus par le constructeur, peut être limitée par

<sup>13</sup>Selon le critère de Rayleigh, le rayon  $r_A$  de l'anneau correspondant au premier minimum nul de la tache de diffraction, autrement connu sous le nom de fonction d'Airy s'écrit :  $r_A = \frac{1.22 \cdot \lambda \cdot f}{D} = \frac{0.63 \cdot \lambda}{NA}$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde du signal détecté,  $f$  la focale du système d'imagerie et  $D$  le diamètre de la pupille du système.

<sup>14</sup>La cohérence peut être définie comme l'ensemble des propriétés de corrélation d'un système ondulatoire. C'est une mesure de la capacité des ondes à donner naissance à des interférences - du fait de l'existence d'une relation de phase. On peut différencier la cohérence temporelle et la cohérence spatiale. La première est liée à la largeur spectrale du rayonnement. En théorie un rayonnement monochromatique présentera une cohérence temporelle infinie. La seconde reflète la capacité de chacun des points du front d'onde à interférer avec n'importe quel autre point.

un choix minutieux des différents éléments en question et pour certains objectifs par le biais d'une bague d'ajustement de la distance parfocale. Malgré toutes ces corrections, un décalage ou tilt, même minime, d'un seul des éléments optiques du système, peut introduire de fortes aberrations dans le système. L'obtention d'une image pratiquement dépourvue d'aberration est donc loin d'être triviale et requiert un soin particulier. Expérimentalement, les deux critères de résolution peuvent être traduits par la fonction d'étalement du point ou réponse impulsionnelle du système (PSF, pour Point Spread Function) qui correspond à l'image en trois dimensions d'un objet ponctuel à travers le microscope. On notera qu'en pratique la détermination de l'expression théorique de cette fonction peut être extrêmement complexe, puisqu'elle nécessite la prise en compte de nombreux paramètres (type d'éclairage, présence ou non d'un trou de filtrage, aberrations du système...) [122][57].

Le contraste, quant à lui, désigne la visibilité des structures par rapport au fond. La microscopie en lumière blanche classique, permet d'imager la différence d'absorption des structures situées dans le plan focal de l'objectif. Lorsque l'on souhaite imager des objets de phase (objet dont les structures présentent une différence d'absorption pratiquement nulle), pour lesquels le contraste en lumière blanche est très faible, on fait appel à des techniques d'imagerie spécialement conçues pour augmenter ce contraste, types contraste de phase ou contraste interférentiel (autrement appelé DIC pour Differential Interference Contrast, ou méthode Nomarski) [113]. Celles-ci requièrent l'utilisation d'objectifs spéciaux couplés à un système d'éclairage adapté (cf. Paragraphe 3.5). Par ailleurs, plus la dynamique en intensité du détecteur utilisé sera grande, plus on sera à même de résoudre des images faiblement contrastées.

## **3.2 Les techniques de microscopie pour la molécule unique**

### **3.2.1 La microscopie grand champ**

La microscopie grand champ est, comme son nom l'indique, une technique qui permet, en illuminant tout le champ de l'objectif, d'imager, en une fois, toute la zone de l'échantillon correspondante. Cette méthode peut être utilisée aussi bien avec un éclairage en lumière blanche (cf. Paragraphe 3.5), qu'avec une source monochromatique adaptée à la microscopie de fluorescence de molécule unique (cf. Figure 10).

Pour commencer, on peut rappeler que le microscope grand champ n'est rien d'autre que celui que l'on qualifie de microscope conventionnel. Il existe deux techniques d'éclairage en microscopie grand champ comme en confocale. La première, à savoir l'éclairage en transmission, consiste à illuminer l'échantillon d'un côté et à récolter le signal de fluorescence de l'autre. Le gros inconvénient de ce type de système est que l'on récupère, sur la voie de détection, toute la lumière d'excitation non absorbée par l'échantillon. La seconde solution, que l'on désigne par le terme d'épifluorescence, répond à ce problème en regroupant excitation et détection du même côté de l'échantillon (cf. Figure 10). C'est cette configuration que nous considérerons par la suite.

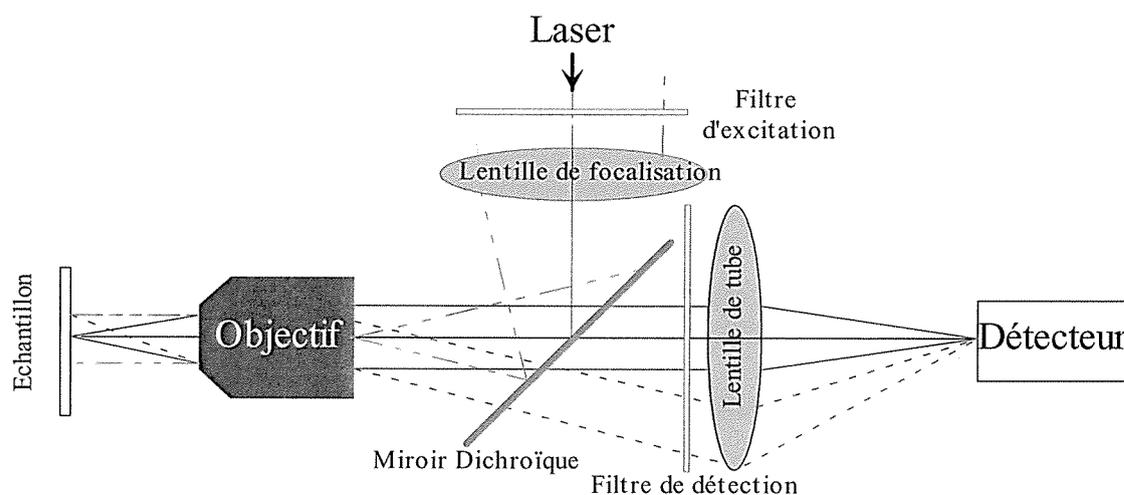


FIG. 10 – Schéma de principe d'un microscope grand champ fonctionnant en mode épifluorescence

Les sources utilisées en microscopie de fluorescence peuvent être des lampes spectrales (du type lampe à vapeur de mercure ou xénon) ou des lasers. Pour réaliser des études spectroscopiques, les lasers présentent un certain nombre d'avantages vis-à-vis des autres sources. En particulier, ils présentent l'intérêt de fournir : suivant le laser impulsionnel ou non, la résolution temporelle qui permet de synchroniser la détection avec le déclenchement du laser ou la finesse spectrale, la directivité de l'éclairage et une plus grande plage de puissances accessibles qui permet d'augmenter l'efficacité d'excitation. Cependant, il faut composer avec la cohérence temporelle et spatiale du rayonnement laser qui peut produire des figures d'inter-

férences et un phénomène de granularité laser (speckle) dans le plan de l'échantillon. Dans de telles conditions, compte tenu également du profil gaussien et donc de la répartition d'énergie non homogène (le front d'onde, dans ce cas, n'est pas plan), on aboutit à un éclairage non uniforme, plus ou moins handicapant suivant le résultat recherché. Il existe des solutions pour remédier à ce problème dont je parlerai au paragraphe 9 du chapitre 4.

En mettant de côté les problèmes d'éclairage communs à toute microscopie de fluorescence, je vais à présent faire brièvement le point sur les avantages et inconvénients de la microscopie grand champ.

Pour commencer, le microscope grand champ présente l'avantage non négligeable d'être simple à réaliser en raison du faible nombre d'éléments qui le constituent (cf. Figure 10), à savoir : un système d'éclairage monochromatique, comprenant un miroir dichroïque et un système de filtres d'excitation et de détection adaptés à la source et à la molécule fluorescente étudiée, un objectif de microscope, une lentille de tube et un système de visualisation des images (un détecteur type CCD). Cette relative simplicité lui confère un prix plus abordable qu'un microscope confocal et également une grande efficacité de collection (la collection en microscopie grand champ, concerne le signal provenant des plans au focus mais également de ceux hors focus).

Cependant, il est important de souligner le fait que, sur un microscope grand champ, il n'existe aucun dispositif destiné à limiter la collection en  $z$ . De ce fait, on récupère la fluorescence provenant de toute l'épaisseur de l'échantillon et dont le cône d'émission est compris dans l'angle d'acceptance du système optique. Ainsi, la limitation du volume sondé sera uniquement reliée à l'épaisseur de l'échantillon. Comme nous avons pu le voir au paragraphe 2.2, le volume sondé joue un rôle incontestable sur le rapport signal sur bruit, il apparaît donc clairement que toute augmentation de l'épaisseur des échantillons se traduira par une dégradation du rapport signal sur bruit et donc de l'image obtenue. En conséquence, même en travaillant avec des échantillons très minces (de l'ordre de la dizaine de microns d'épaisseur), la détection de molécule unique sera très difficile. On réservera donc cette technique aux molécules multi-marquées (telles que les molécules d'ARN ou d'ADN) dont le signal de fluorescence est assez intense.

L'effet de flou résultant de la contribution du signal des plans hors focus, collecté du fait de l'absence de filtrage, peut être minimisé, et le contraste rehaussé, par l'applica-

tion d'algorithme post acquisition comme la déconvolution [89]. La déconvolution utilise la fonction d'étalement du point ou réponse impulsionnelle (PSF) de l'instrument [148] :  $ImageExpérimentale = PSF \otimes objet$ , où le symbole  $\otimes$  représente le produit de convolution, pour reconstituer l'image en trois dimensions de l'objet étudié. C'est un procédé mathématique qui permet d'éliminer la distorsion des images liée à la réponse impulsionnelle du microscope qui n'est pas un pic de Dirac. Cette technique est efficace à condition que l'échantillon ne soit pas trop complexe ou, autrement dit, que le bruit ramené par les plans hors focus ne soit pas trop important. En outre, que l'on considère le cas de la microscopie grand champ ou celui de la microscopie confocale, la taille des pixels constituant les détecteurs est telle qu'une atténuation des hautes fréquences spatiales est inévitable. Seule la déconvolution d'images grand champ (ou confocales) peut, dans certaines conditions, permettre de retrouver, en partie, à partir du signal hors focus, les détails ainsi perdus, fournissant à cette technique une efficacité de résolution équivalente voire supérieure à celle obtenue avec une image confocale brute.

Un autre avantage de la microscopie grand champ est qu'elle permet, couplée à la déconvolution, de minimiser le photoblanchiment des échantillons, car elle ne nécessite qu'une image par plan focal. Ceci lui confère également une certaine rapidité qui rend possible l'imagerie d'échantillons en mouvement.

Une autre technique appelée illumination structurée [106][107][58] peut apporter une amélioration notable à la qualité des images grand champ. Elle consiste à projeter l'image d'une grille dans le plan de l'échantillon, à enregistrer une première image, et décaler la grille typiquement d'un tiers de sa période, puis à répéter ce protocole trois fois afin d'acquérir toutes les données nécessaires à la reconstitution de l'image du spécimen sans perdre d'information. L'image obtenue après avoir appliqué l'algorithme d'extrapolation aux trois images grille /échantillon correspond à celle de l'échantillon dans le plan focal, le bruit des plans adjacents ayant été éliminé. Elle présente le désavantage de complexifier le système et de diminuer sa rapidité (elle requiert trois acquisitions pour obtenir une image), mais permet l'obtention d'images mieux résolues que celles classiquement acquises en grand champ.

Pour conclure, il faudra garder à l'esprit que cette technique est souvent limitée par le bruit lié à l'absence de filtrage en z, et que même en déconvoluant l'image acquise, on ne peut éliminer le bruit fluctuant.

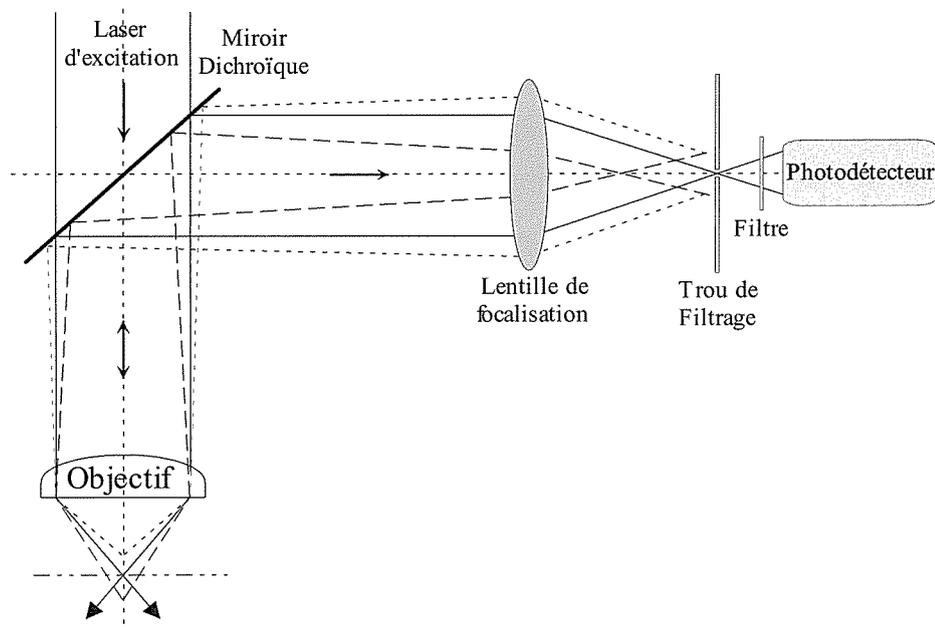


FIG. 11 – Schéma de principe d'un microscope confocal

### 3.3 La microscopie confocale

La microscopie confocale [155] diffère de la microscopie grand champ pour deux raisons : d'une part, l'illumination de l'échantillon s'effectue point par point ce qui nécessite l'ajout d'un système de balayage du spécimen ou du faisceau excitateur indispensable en imagerie (on parle alors de microscope confocal à balayage) et, d'autre part, un trou de filtrage est positionné dans le plan conjugué de l'échantillon (plan focal de la lentille de tube), avant le détecteur. Ce dernier permet de rejeter en grande partie le signal provenant des plans de l'échantillon situés hors focus (cf. Figure 11) et de ce fait d'améliorer le rapport signal sur bruit. Il est également utile de souligner la différence entre les détecteurs utilisés en microscopie grand champ et en microscopie confocale. L'imagerie point par point ne requiert pas une matrice 2D du type caméra CCD. En conséquence on utilise plutôt, pour la détection de molécule unique, une photodiode à avalanche.

Les images obtenues avec un microscope confocal, dont le système de filtrage est bien adapté (suffisamment petit pour supprimer la partie indésirable du signal, mais pas trop,

pour ne pas éliminer le signal utile), sont en règle générale, hormis le cas d'échantillons très épais, moins bruitées que celles obtenues en grand champ. En effet, grâce au filtrage, on rejette en grande partie le signal provenant des plans hors focus. Ainsi, à partir d'une pile d'images acquises en différents plans de focalisation, on peut reconstituer une image 3D du spécimen. Cependant, l'imagerie point par point implique une illumination prolongée des échantillons, susceptible de conduire à leur photoblanchiment. En effet, tous les photons émis ne sont pas détectés puisque l'on éclaire toute l'épaisseur de l'échantillon, mais, que l'on image uniquement le plan focal. Pour ne pas perdre d'information, du fait du photoblanchiment et lorsque le bruit de fond n'est pas trop important, il s'avère donc plus intéressant d'utiliser un montage grand champ, puis d'appliquer un algorithme de déconvolution à la pile d'images. On notera que la qualité des images confocales, en particulier pour l'imagerie de spécimens biologiques, peut également être améliorée par l'application, après acquisition, d'un algorithme de déconvolution [32][81].

De plus, l'obtention d'une image confocale requiert un temps d'acquisition relativement long, même avec un balayage rapide de l'échantillon. Ainsi, l'imagerie de molécules en mouvement (molécules en solution, cellules vivantes, ...) sera plus difficilement compatible avec la microscopie confocale en général plus lente.

En choisissant bien les différentes optiques et en alignant scrupuleusement le montage, on peut, en microscopie confocale, s'attendre à une efficacité de collection autour de 3%. On peut comparer cette valeur à celle obtenue avec un microscope grand champ optimisé. Si l'on considère le signal provenant du plan focal, comme c'est le cas en microscopie confocale, on atteint une efficacité de collection de 10% à 14%, et à ce signal collecté s'ajoutent également les contributions des plans hors focus dont on ne récupère pratiquement rien sur un montage confocale. Ainsi la quantité d'information contenue dans une image grand champ est bien plus importante qu'en microscopie confocale.

Toutefois, pour les études spectroscopiques, l'avantage du microscope confocal à balayage est que, du fait du caractère point par point de l'acquisition, on est à tout instant capable de localiser l'élément correspondant à la réponse spectrale enregistrée.

À l'issue de cette discussion, il apparaît donc que les deux techniques que je viens de présenter possèdent des caractéristiques différentes qui en font deux bons outils d'analyse. Le choix de l'une ou de l'autre doit donc être fait après une étude soignée des besoins de

l'expérience.

### 3.4 La microscopie biphotonique

Décrite pour la première fois en 1990 [33] et rapidement appliquée à la détection de molécule unique [93], la microscopie biphotonique est une technique d'imagerie de fluorescence qui peut, pour certaines expériences comme celles visant à étudier des échantillons épais, s'avérer être un outil mieux adapté que les deux techniques précédemment introduites. D'un point de vue du montage optique, le microscope biphotonique peut être directement implanté sur un microscope confocal inversé en supprimant (ou non) le trou de filtrage et surtout en y ajoutant un laser d'excitation capable de délivrer des impulsions brèves dont la durée doit être de l'ordre de la centaine de femtosecondes.

#### 3.4.1 Intérêt de la microscopie biphotonique

La probabilité d'absorption simultanée de deux photons dépend de la section efficace d'absorption à deux photons<sup>15</sup>,  $\sigma_a^{2ph}$ , exprimée en Gopper Mayer (1GM =  $10^{-50}\text{cm}^4\cdot\text{s}\cdot\text{molécule}^{-1}\cdot\text{photon}^{-1}$ ). Elle est plus faible qu'à un photon et typiquement de l'ordre de 1GM à 10GM pour les bons fluorophores. Le taux d'absorption,  $k_e^{2ph}$ , à deux photons est également proportionnel au carré de l'intensité excitatrice moyenne, et s'écrit :

$$k_e^{2ph} = \frac{1}{2}\sigma_a^{2ph}(I) \left( \frac{I}{h\nu} \right)^2 \quad (2.28)$$

Comme nous l'avons vu lors de notre étude du rapport signal sur bruit, pour être efficace l'excitation doit atteindre des intensités crêtes importantes. Cette condition n'étant vérifiée que dans un très petit volume autour du point focal, ceci confère à la microscopie biphotonique une résolution tridimensionnelle (latérale mais surtout axiale) intrinsèque.

On pourra se reporter à la référence [112] pour une comparaison complète entre PSFs d'un microscope grand champ, d'un microscope confocal à balayage et à deux photons.

<sup>15</sup>La section efficace d'absorption à deux photons vers le  $f^{ème}$  niveau excité est donnée, dans l'approximation Gaussienne, par la relation suivante [80] :  $\sigma_a^{2ph(f,o)} = \frac{(2\pi e)^4}{(ch)^2} \nu_\alpha \nu_\beta g(\nu_\alpha + \nu_\beta) \left| S_{\alpha,\beta}^{(f,o)} \right|$

où  $\nu_\alpha$  et  $\nu_\beta$  correspondent aux fréquences respectives des deux photons lasers absorbés;  $g(\nu_\alpha + \nu_\beta)$  représente le profil de raie normalisé et  $S_{\alpha,\beta}^{(f,o)}$  est le tenseur d'absorption à deux photons. C'est un tenseur de rang deux qui traduit le taux et la dépendance en polarisation de l'absorption à deux photons.

Comme seule la zone directement à proximité du point focal de l'objectif de microscope reçoit une intensité crête suffisante pour engendrer une excitation significative de la fluorescence, le phénomène de photoblanchiment à deux photons ou la production non linéaire de radicaux libres sont également confinés dans la zone d'excitation efficace. Bien évidemment, le faisceau traverse tout de même la totalité de l'échantillon. Cependant, les longueurs d'onde utilisées pour l'excitation biphotonique, souvent IR ou proche IR, bien moins énergétiques qu'en microscopie de fluorescence, sont en général beaucoup moins absorbées par la matrice d'étude et donc engendrent beaucoup moins d'autofluorescence, de signal parasite de diffusion et de dommages. Elle est nettement moins invasive et donc préjudiciable pour les échantillons biologiques souvent très fragiles, en particulier dans le cas d'une étude *in vivo*. Toutefois, les fortes intensités mises en jeu peuvent parfois générer de nouveaux signaux parasites non linéaires.

Le second avantage de la microscopie à deux photons vient du décalage beaucoup plus grand entre la longueur d'onde excitatrice et la longueur d'onde de la fluorescence comparé au cas d'une excitation à un photon. En effet, le filtrage spectral du signal laser dans la voie de détection est aisément réalisé, et le bruit de fond correspondant devient beaucoup plus faible qu'en microscopie de fluorescence classique.

La faible absorption des tissus dans cette gamme de longueurs d'onde, mais également tous les avantages énoncés précédemment, permettent de travailler sur des spécimens beaucoup plus épais et donc de procéder au séquençage optique sur des profondeurs d'échantillons bien plus grandes qu'en microscopie confocale ou en grand champ. Dans un milieu diffusant, la profondeur de pénétration d'une excitation biphotonique est de l'ordre de 400 microns ce qui permet de travailler sur des embryons [112], des tissus [108] et même sur des animaux vivants [21][147].

### **3.4.2 Comparaison du volume focal à un et deux photons**

On définit le volume focal effectif à un comme à deux photons par l'expression suivante [92] :

$$V_{eff} = \frac{\left[ \int W(r) dr \right]^2}{\int W^2(r) dr} = \gamma^{-1} \int W(r) dr \quad (2.29)$$

Avec  $W(r)$  la distribution spatiale de l'émission et :

$$\gamma = \frac{\int W^2(r) dr}{\int W(r) dr} \quad (2.30)$$

le contraste volumique qui caractérise la pente des limites du volume focal. Il est compris entre 0 et 1 et est tel que  $\gamma = 1$  correspond à une fonction porte.

On peut l'évaluer numériquement dans le cas d'un échantillon plus épais que la profondeur de champ de l'objectif :

— Pour un profil Gaussien-Gaussien [70] pour une excitation à deux photons,  $\gamma = \frac{1}{2\sqrt{2}}$  [1] :

$$V_{eff} = \left( \frac{\pi}{2} \right)^{\frac{3}{2}} \omega_r^2 \omega_z \quad (2.31)$$

Avec  $\omega_r$  et  $\omega_z$  respectivement les dimensions radiales et axiales du volume focal.

On obtient, pour une excitation à 800nm, avec  $\omega_r \approx 0,52 \frac{\lambda}{\sin \theta}$  et  $\omega_z \approx 0,76 \frac{\lambda}{1 - \cos \theta}$ , et pour un objectif à immersion NA=1,25 avec  $n=1,515$  :  $V_{eff} \approx 0,7 \mu m^3$ .

— Pour un profil Gaussien-Gaussien pour une excitation à un photon [134] :

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_r^2 \omega_z \quad (2.32)$$

En conservant les conditions expérimentales précédentes, mais avec une excitation à 488nm, on obtient dans ce cas  $V_{eff} \approx 0,45 \mu m^3$ . Avec une excitation à 800nm on obtient  $V_{eff} \approx 1,99 \mu m^3$  On constate donc qu'avec une excitation biphotonique on divise pratiquement le volume focal par un facteur trois.

### 3.5 Visualiser les échantillons en lumière blanche

Afin d'avoir accès à la structure des échantillons, en particulier en biologie où l'on souhaite visualiser l'anatomie des spécimens étudiés, on fait souvent appel aux techniques de microscopie grand champ en lumière blanche. Le système du microscope grand champ en lumière blanche peut fonctionner, comme en fluorescence, sur le principe d'un éclairage en transmission, avec un système d'illumination et de détection de part et d'autre de l'échantillon, ou en réflexion. On se limitera dans la suite de ce paragraphe au cas du microscope en transmission identique à celui que j'ai utilisé au cours de ma thèse. Pour obtenir une imagerie de bonne qualité, on utilisera un condenseur à lumière blanche fonctionnant sur le principe de l'éclairage Köhler qui consiste à imager, via une lentille, le diaphragme de champ présent dans le condenseur, directement sur l'échantillon.

Limiter l'illumination à une partie du spécimen, avec une ouverture adaptée à l'objectif, minimise la lumière parasite diffusée et permet d'augmenter le contraste de l'image (cf. Figure 12). Cette configuration permet aussi d'éviter le photoblanchiment des zones non observées. L'autre grand avantage est l'homogénéité de l'éclairage obtenu car chaque point de la source lumineuse (filament) éclaire l'ensemble du champ et la structure de la source n'apparaît pas sur l'image. Un des éléments clé de ce système est le diaphragme d'ouverture. En faisant varier la taille de l'ouverture de ce diaphragme, on modifie le cône d'illumination. Une ouverture trop importante se traduira par un éblouissement du champ et une perte de contraste, tandis qu'un diaphragme de champ trop fermé augmentera la diffraction et engendrera une perte de résolution. Il existe donc une position intermédiaire optimale, qui correspond à une ouverture entre 60 et 90 pour cent.

Cependant, dans le cas d'un objet de phase, même en optimisant au mieux l'éclairage, pour obtenir une image contrastée du spécimen, il faudra recourir à des techniques telles que le contraste de phase<sup>16</sup> (cf. Figure 13) ou le contraste interférentiel (DIC). Ces deux méthodes interférentielles permettent de visualiser le retard de phase introduit par la traversée de l'échantillon. Plus précisément, le contraste de phase transforme le faible déphasage

---

<sup>16</sup>D'après la théorie d'ABBE, l'image issue d'un objet microscopique transparent est formée par la juxtaposition de deux images différentes. La première, directe, issue des parties uniformes de l'objet, et la seconde, produite par la diffraction due aux irrégularités de l'objet. Fritz Zernike a donc eu l'idée de produire artificiellement un décalage de phase entre ces deux images en apportant grâce à une lame de phase une avance (ou un retard, dans ce cas on a un contraste de phase négatif) de la phase de la première image qui se transforme en image d'amplitude.

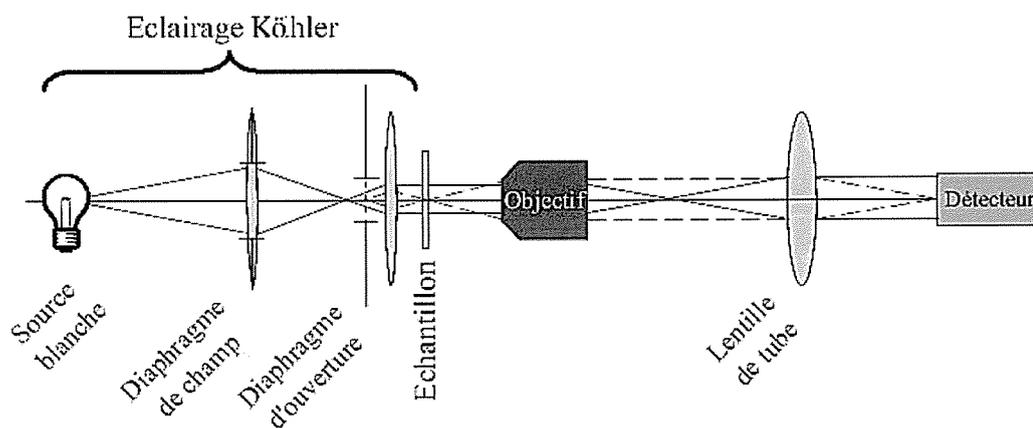


FIG. 12 – Schéma de principe d'un microscope grand champ muni d'un éclairage Köhler.

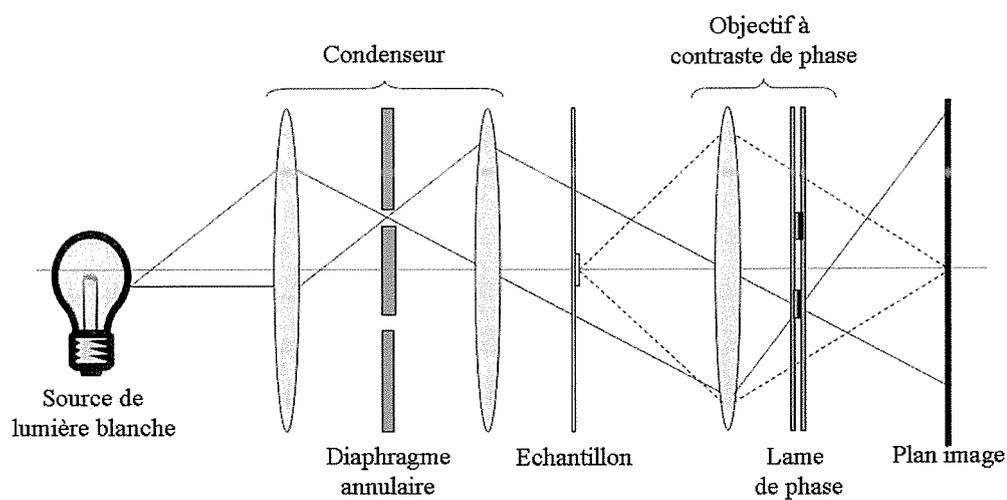
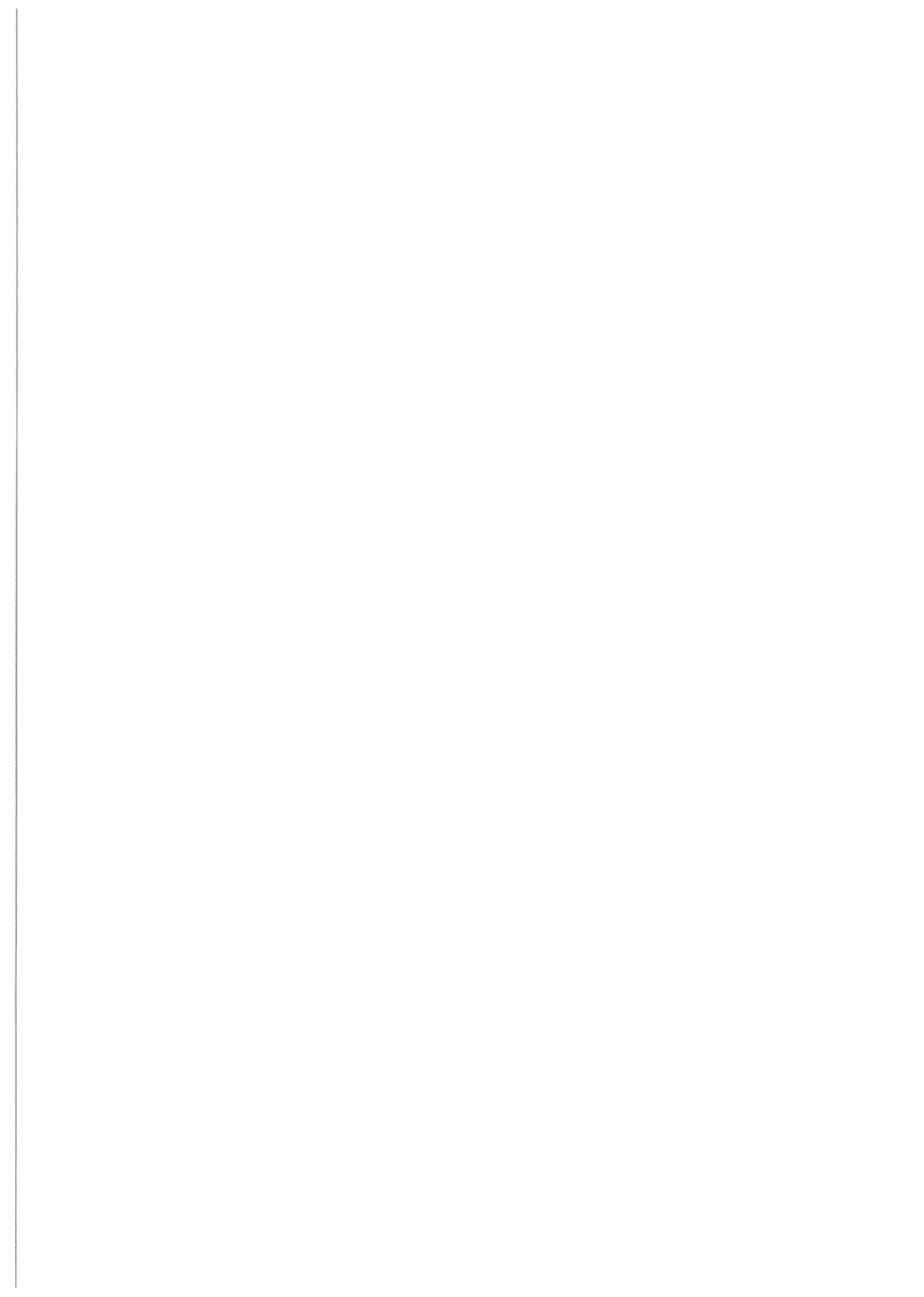


FIG. 13 – Schéma de principe de l'imagerie grand champ de contraste de phase.

introduit par le spécimen, du fait des variations d'indice de réfraction, en variations d'amplitude. Cette transformation nait des interférences entre la lumière du condenseur qui n'a pas traversé l'échantillon, déphasée de  $\frac{\pi}{2}$  par l'anneau de phase présent dans l'objectif et la lumière diffractée par l'échantillon.

La microscopie interférentielle permet de résoudre efficacement la structure anatomique d'échantillons biologiques, comme ceux que j'ai été amenée à étudier dans le cadre de mes travaux de thèse. Elle constitue donc un outil de choix puisqu'elle offre la possibilité de comparer les images en fluorescence avec les structures anatomiques correspondantes.







## Troisième partie

# Caractérisation d'une sonde calcique par Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence.

## 4 Motivations et principe de l'expérience

L'expérience à laquelle est dévolu ce chapitre est une expérience de spectroscopie de corrélation de fluorescence visant à caractériser la dynamique d'une réaction de complexation/décomplexation impliquant une sonde calcique fluorescente, l'Oregon Green BAPTA 5N, et l'ion calcium  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 4.1 Motivations

Depuis la synthèse de la première sonde calcique par Tsien en 1980 [154], le nombre et la variété des sondes calciques<sup>17</sup> et autres sondes ioniques disponibles n'a cessé d'augmenter. De plus, l'application de plus en plus courante de ces sondes aux études *in vivo* (sur cellules vivantes isolées comme sur organismes) oriente les recherches vers le développement de nouvelles molécules avec des propriétés optimisées et innovantes [127], capables de fonctionner en quantités très faibles afin d'interférer au minimum avec les mécanismes étudiés. Certaines de ces sondes dites codées génétiquement sont des protéines, synthétisées par la cellule, qui se comportent comme des indicateurs colorés spécifiques de certains ions (tels que le calcium), comme par exemple la GCaM [71] ou la protéine Caméléon [19]. Non seulement ces sondes (synthétiques ou codées génétiquement) ne sont pas synthétisées en grande quantité, mais surtout leurs propriétés dépendent de leur environnement moléculaire. En conséquence, il est

---

<sup>17</sup>L'utilité des sondes calciques n'est plus à prouver. En effet le calcium est un acteur indispensable dans le corps humain, présent aussi bien dans le plasma qu'à l'intérieur des cellules. Un grand nombre de phénomènes mis en jeu dans le métabolisme calcique intracellulaire demeurent toujours incompris. Ils font intervenir d'infimes variations de la concentration calcique cytoplasmique, déjà initialement faible, d'où la nécessité de fabriquer des sondes toujours plus sensibles et mieux adaptés aux phénomènes étudiés.

important de développer une méthode de caractérisation compatible avec des mesures *in vivo* ce qui implique en particulier de travailler avec de faibles concentrations.

Actuellement, les techniques mises en œuvre afin d'analyser la cinétique réactionnelle des processus chimiques comme ceux mis en jeu lors du fonctionnement des sondes ioniques, sont, le plus souvent, des techniques dites de relaxation. La plus ancienne qui a prouvé son efficacité pour l'étude de sondes relativement lentes est le "stop flow" [84], toutefois le principe du stop flow ne lui permet pas d'être appliqué *in vivo*. D'autres techniques telles que l'électrophysiologie, généralement appelée "patch-clamp"[137], la "flash photolyse" [45] ou encore la relaxation par saut de température [69] [104] ne sont, par contre, pas incompatibles avec les expériences *in vivo*, bien que chacune d'elles présente des difficultés encore non résolues pour une telle application. Ces dernières techniques de relaxation consistent à placer le système chimique étudié hors d'équilibre en lui appliquant une perturbation macroscopique sous forme d'une impulsion électrique (nécessitant l'implantation d'électrodes dans la cellule étudiée), d'un flash UV, d'un saut de température, ou de pression et à observer le retour du système à l'équilibre. Dans le cas du "patch-clamp", l'injection de courant dans la cellule nerveuse crée un ou des potentiels d'action (dépendant du voltage) qui conduisent à l'entrée de calcium au niveau des canaux calciques présents en particulier au niveau des synapses. La "flash photolyse" et la relaxation par saut de température, quant à elles, reposent sur l'injection, dans les cellules, en quantité relativement importante, d'un élément capable de libérer l'ion désiré (par exemple le calcium) après un flash UV ou un choc thermique, puis sur la mesure de la dynamique de réponse de la molécule étudiée à cette injection rapide d'ions. Ces techniques présentent, cependant, des inconvénients majeurs. D'une part, la gamme de dynamiques temporelles accessibles est limitée, en particulier pour la relaxation par saut de température qui ne permet pas de mesurer les fluctuations rapides. D'autre part, elles disposent d'une faible sensibilité nécessitant l'injection, dans les cellules, d'une quantité de sondes et de molécules engageant l'ion désiré relativement importante, les concentrations injectées allant de quelques centaines de  $\mu M$  à quelques dizaines de  $mM$ . Enfin, elles présentent une toxicité élevée, liée non seulement à la toxicité des molécules injectées, mais également aux processus d'injection et aux autres perturbations extérieures nécessaires. C'est le cas, en particulier, en "flash photolyse" qui utilise un rayonnement UV. Ces inconvénients, ainsi que le besoin de placer le système hors d'équilibre pour déterminer la dynamique temporelle de

la molécule examinée, font de ces techniques des moyens d'étude invasifs et assez lourds à mettre en œuvre.

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) offre une alternative intéressante puisqu'elle permet d'accéder à des processus dynamiques, à partir des fluctuations spontanées du système, avec une grande sensibilité, sans interférer avec l'équilibre du système étudié et en travaillant à faible concentration en molécules fluorescentes. Ce chapitre est consacré à décrire les expériences de FCS que j'ai développées afin d'étudier la dynamique temporelle de sondes calciques<sup>18</sup> par une approche applicable *in vitro* comme *in vivo*, avec une sensibilité proche de celle de la molécule unique.

La FCS, technique optique d'analyse temporelle et spatiale haute résolution, est une méthode intéressante car elle a déjà fait ses preuves, *in vivo* comme *in vitro* [123][29] jusqu'à l'échelle de la molécule unique. Le concept de la FCS et sa première réalisation pratique furent développés par Madge et Elson [86][87] qui décidèrent initialement de l'appliquer à l'étude d'une réaction biochimique de complexation entre l'éthilium Bromide (petit colorant intercalant) et l'ADN. Cependant, à l'époque, les technologies disponibles n'offraient qu'une sensibilité réduite et ne permettaient pas de travailler à l'échelle de la molécule unique (la concentration en molécules étudiées était de l'ordre de  $1.10^{-7}M$  pour un volume de  $10^{-8}cm^3$  ce qui correspond à une moyenne de 10000 molécules dans le volume focal). De nombreux articles théoriques ont ensuite porté sur les applications de la FCS pour l'analyse de la diffusion de molécules fluorescentes, de dynamiques chimiques moléculaires [4][117], ainsi que sur l'optimisation des systèmes optiques [116][64] et sur le développement de modèles mathématiques [74] décrivant les différents phénomènes étudiés [88][162][92][42]. Ces modèles ont rapidement été appliqués à de nombreuses expériences et, l'utilisation du microscope confocal a permis d'atteindre l'échelle de la molécule unique [125]. On peut citer, par exemple, les travaux visant à la mesure de coefficients de diffusion à l'échelle de la molécule unique, en solution [73], près d'une interface [131] ou dans une cellule [20]. D'autres, basés sur l'analyse de la dynamique de passage dans l'état triplet de molécules comme la rhodamine 6G ou la fluorescéine, ont permis de remonter au taux de conversion singulet-triplet [161] et à ses variations en fonction des conditions expérimentales (polarité des solvants, viscosité, présence d'oxygène,...). La

---

<sup>18</sup>On gardera à l'esprit que la technique pourrait être appliquée à d'autres types de sondes comme les sondes à pH ou les sondes ioniques, mais par la suite nous ne parlerons plus que du calcium qui fut le support de notre étude.

FCS a également été utilisée pour l'étude de dynamiques d'hybridation de l'ADN par un brin marqué de sa séquence complémentaire [72][136], pour l'étude de dynamiques enzymatiques en inhibant le processus à différentes étapes [94], ou encore, pour la mesure *in vitro*, comme *in vivo*, d'interactions protéine-protéine avec une excitation monophotonique [85] puis bi-photonique [71][70]<sup>19</sup>, toutes ces études s'appuyant sur l'interprétation des modifications du coefficient de diffusion induites par les divers mécanismes mis en jeu. Les dynamiques temporelles de protonation de marqueurs fluorescents très répandus tels que l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)[63], la fluorescéine [163], comme celle du clignotement rapide de la YFP (Yellow Fluorescent Protein)[135], ou encore, la dynamique de photoactivation de la protéine Kaede (dérivée de la GFP)[37] ont aussi pu être caractérisées par FCS. Par ailleurs, des travaux ont été menés afin de mesurer la dynamique de conformation d'une sonde calcique [151] ou encore afin de déterminer l'affinité et la dynamique temporelle d'une autre sonde calcique [19]. Pour cette dernière expérience, la cinétique du senseur ratiométrique calcique Caméléon (composé d'une molécule de calmoduline et de deux marqueurs fluorescents l'ECFP et L'YFP<sup>20</sup> comme présenté à la figure 14) a, d'une part, été étudiée par mesure des variations de l'intensité de FRET (Förster Resonance Energy Transfert) en fonction de la concentration calcique, un transfert d'énergie pouvant dans certaines configurations avoir lieu entre une molécule de ECFP et de YFP et, d'autre part, par corrélation croisée du signal émis par les deux fluorophores, les molécules ne pouvant pas diffuser librement puisque figées dans un gel d'agarose. Cette expérience, plus lourde à mettre en oeuvre qu'une expérience de FCS classique, a prouvé son efficacité dans le cadre de l'étude d'une sonde protéique FRET. Cependant, elle n'est pas applicable à tous les types de molécules. Elle a fourni des résultats probants sur la dynamique du transfert d'énergie pour trois concentrations calciques différentes, mais ne peut être envisagée pour caractériser la dynamique chimique d'un processus de complexation mettant en jeu une molécule plus simple pour laquelle le FRET n'est pas applicable.

Lorsque l'on souhaite caractériser l'évolution temporelle de la quantité de calcium impli-

---

<sup>19</sup>On notera que ces deux expériences ont été réalisées par Spectroscopie de corrélation de fluorescence croisée (FCCS) à deux couleurs. Cette technique dérivée de la FCS permet via un double système de détection de corrélérer les signaux de fluorescence émis par deux molécules fluorescentes présentant des spectres d'émission différents.

<sup>20</sup>L' ECFP, Enhanced Cyan Fluorescent Protein et l'YFP, Yellow Fluorescent Protein, sont des dérivés de la green fluorescent protein (GFP).

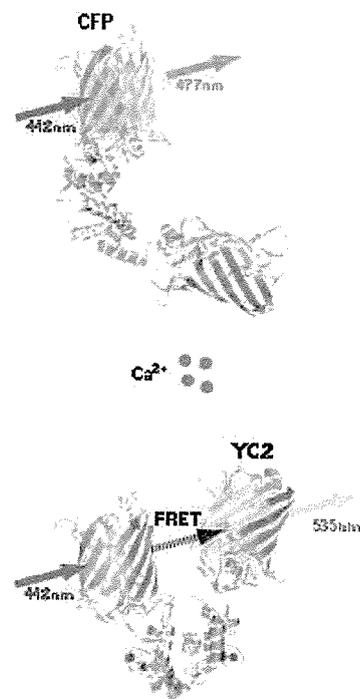


FIG. 14 – Schéma de la molécule Caméléon fonctionnalisée et principe de FRET entre les deux marqueurs fluorescents auxquels elle est attachée.

qué dans un quelconque mécanisme biologique, il est indispensable que la dynamique de la sonde soit plus rapide que celle du processus étudié, sous peine d'arriver à des conclusions erronées (par exemple, pour étudier les mécanismes présynaptiques entrant en jeu dans la transmission du message nerveux [36], il faudra faire appel à une sonde rapide). Nous avons donc choisi d'utiliser la FCS afin de tester si cette approche pouvait nous permettre de caractériser une sonde calcique très courante, l'Oregon Green BAPTA 5N, beaucoup plus rapide que les sondes telles que la Calmoduline et dont la dynamique n'est pas encore bien connue. On dispose toutefois d'un résultat récemment obtenu par Flash photolyse [45] qui donne un point de comparaison intéressant pour valider notre approche. La caractérisation de l'Oregon Green BAPTA 5N est d'un intérêt très général du fait de la large utilisation de cette sonde, mais elle est spécialement intéressante dans l'étude de la dynamique de la concentration calcique au niveau des synapses pour lesquelles on attend des variations rapides liées à la structure des synapses, à la présence de nombreux tampons calciques et au transport actif.

Ainsi, au cours de mes travaux de thèse, nous avons poursuivi plusieurs buts : tout d'abord implanter une méthode spectroscopique bien adaptée à l'étude de phénomènes de diffusion spatiale et de processus physiologiques en milieu liquide, puis mesurer la sensibilité limite de cette méthode aussi bien à un qu'à deux photons et enfin, appliquer cette technique à l'étude d'une sonde calcique que nous chercherons à caractériser le plus finement possible et de façon fiable. Je vais donc vous présenter la technique et le protocole expérimental que nous avons mis au point à cet effet, grâce à un système optique simple et optimisé. J'expliciterais comment nous sommes parvenus à calibrer la dynamique temporelle d'une sonde en fonction de la quantité d'ion cible en présence. Au préalable, je vais introduire plus précisément les fondements de la FCS.

## 4.2 Le principe de la FCS

### 4.2.1 Introduction

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une méthode d'investigation de la dynamique moléculaire, appartenant à la famille des techniques statistiques de corrélation de fluctuation. Présentée pour la première fois en 1972 par Magde, Elson et Webb [86][87], la FCS fut initialement appliquée à la mesure de la diffusion et de l'équilibre chimique entre

l'ADN et un petit colorant intercalant (EtBr), comme je l'ai mentionné au paragraphe précédent. Mais il fallut attendre les années 90 pour que Rigler [126][124] allie la microscopie confocale à la FCS afin d'augmenter l'efficacité de détection et de diminuer le bruit de fond, ce qui lui permit d'étudier la diffusion de la rhodamine 6G à l'échelle de la molécule unique. La FCS est fondée sur le principe d'analyse des fluctuations statistiques de l'intensité de fluorescence provenant d'un petit volume expérimental (environ  $10^{-15}$  litres). Définie généralement par la focalisation d'un faisceau laser à travers un microscope confocal, la taille du volume sondé dépend de l'objectif utilisé et des caractéristiques du filtrage spatial.

Afin d'introduire de manière simple le principe physique de la FCS, je vais considérer le cas d'une solution très diluée, de telle sorte que l'on observe les molécules diffuser une par une à travers le volume focal. Une molécule fluorescente, dont l'efficacité de fluorescence  $\phi_f$  et la section efficace d'absorption  $\sigma_{abs}$  sont suffisantes (on examinera pour le moment le cas simple  $\phi_f$  et  $\sigma_{abs}$  constants) émet un paquet de photons, lorsqu'elle traverse le volume d'étude. Sa durée est liée aux dimensions du volume expérimental et aux propriétés de diffusion de la molécule. Il n'est pas toujours possible d'analyser directement ces paquets de photons en raison du bruit de fond. L'information peut par contre être extraite de l'autocorrélation du signal temporel de fluorescence pour laquelle il est possible d'obtenir un rapport signal sur bruit satisfaisant. En effet, la lumière diffusée ou l'autofluorescence résiduelle, liée à de nombreuses molécules faiblement fluorescentes, constituent un bruit quasi-blanc et ne donnent pas de structure temporelle à la fonction d'autocorrélation dans les échelles de temps observées ( $\mu s - s$ ). Si, par contre, on s'intéresse à une petite population de molécules de même nature, l'émission du signal de fluorescence est alors régie par les mêmes équations dynamiques pour toutes ces molécules, qu'il s'agisse de la diffusion, d'une dynamique interne ou d'une dynamique liée à une réaction chimique. La détection d'un photon fournit une information sur l'état dynamique courant de la molécule. Par exemple, la détection d'un photon correspond à une probabilité plus forte que la molécule soit présente dans le volume focal et qu'elle soit dans une conformation favorable à la fluorescence, et inversement. Par conséquent, la détection d'un photon augmente la probabilité de détection d'un second photon et ceci durant un temps caractéristique lié aux phénomènes dynamiques ayant lieu (diffusion ou changement de conformation). Ce phénomène s'appelle le groupement de photons ("bunching" dans la littérature de langue anglaise). Il se manifeste par l'existence d'un paquet de photons émis par la

molécule pendant la traversée du volume utile. Il apparaît donc dans la fonction d'autocorrélation des structures temporelles dont les largeurs sont spécifiques des temps caractéristiques des différents processus. En calculant l'autocorrélation du signal temporel de fluorescence, on fait la moyenne sur tous les passages des molécules d'intérêt et, on élimine la contribution des signaux parasites non corrélés, ce qui permet d'obtenir un bon rapport signal sur bruit.

En pratique, il n'est pas indispensable d'étudier les molécules une par une, on peut appliquer le même raisonnement pour quelques molécules diffusant simultanément dans le volume focal. Pour généraliser le principe de fonctionnement de la FCS, nous allons formaliser ces idées.

#### 4.2.2 Approche théorique des bases de la FCS.

En pratique, les fluctuations du signal de fluorescence reflètent la diffusion des molécules entrant et sortant du volume focal, mais également, les réactions chimiques et les changements de conformation ou d'orientation des molécules, au sein de ce même volume d'étude. Cette technique permet donc d'obtenir des informations quantitatives sur la dynamique de l'ensemble des processus physiques et chimiques, modulant la fluorescence émise dans le volume sondé, et ce, à des échelles temporelles allant de  $10^{-7}$  [161] à plus de  $10^2$  secondes [64][123]. Une condition doit, toutefois, être vérifiée si l'on souhaite observer un processus chimique, photochimique ou de reconformation, faisant passer une molécule d'un état A fluorescent à un état B non fluorescent. Il est indispensable, au cours d'une période d'observation, définie comme l'intervalle temporel séparant en moyenne l'entrée et la sortie d'une même molécule du volume d'observation, que, statistiquement, au moins un cycle  $A \rightarrow B \rightarrow A$  puisse avoir lieu ou, autrement dit, que le temps de diffusion soit suffisamment long par rapport au phénomène étudié.

La difficulté de résoudre les fluctuations de fluorescence d'un unique ou de quelques individus, et le caractère stochastique de la diffusion des molécules dans l'échantillon, imposent en général une accumulation temporelle du signal de fluorescence afin d'acquérir une statistique représentative. Ainsi obtenues, les données brutes du signal de fluorescence au cours du temps, sont généralement peu exploitables. De ce fait, quand le dépouillement direct des paquets de photons n'est pas envisageable<sup>21</sup>, il est nécessaire d'effectuer une analyse statistique

<sup>21</sup>La technique utilisée dans ce cas est généralement connue sous le nom de méthode de l'histogramme de

via l'autocorrélation,  $G(\tau)$ <sup>22</sup>, du signal de fluorescence,  $F(t)$ , pour remonter aux paramètres de diffusion et éventuellement réactionnels des molécules dans la matrice d'étude (cf. Figure 15).

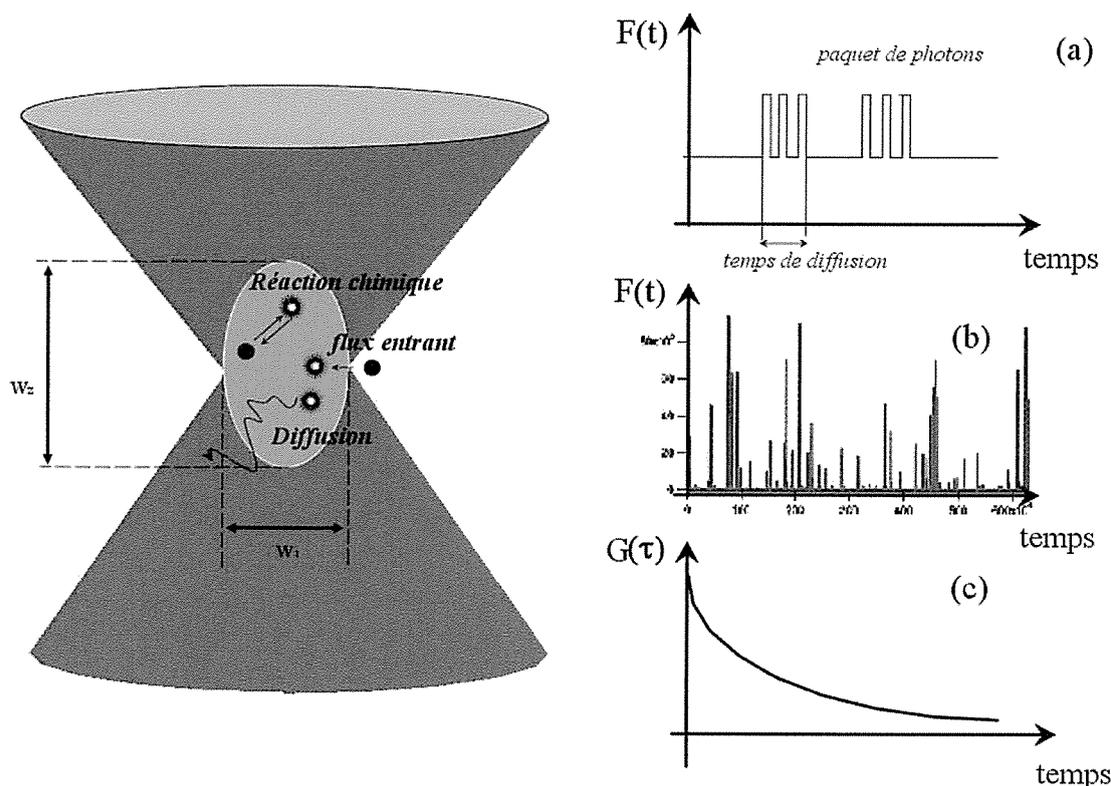


FIG. 15 – Schéma de principe d'une expérience de FCS.

À gauche est représenté le volume focal et les différents évènements pouvant être étudiés. Le graphique (a) illustre schématiquement les variations temporelles du signal de fluorescence pour des molécules traversant le volume focal et clignotant durant cette traversée. Le graphique (b) représente le type de signal brut de fluorescence que l'on obtient au cours d'une expérience de comptage de photon unique, lorsque le signal sur bruit n'est pas suffisant pour résoudre les paquets de photons par rapport au bruit de fond. C'est typiquement dans ce cas que l'on aura recours à la FCS, l'analyse directe des paquets de photons étant impossible. Le dernier graphique (c) schématise l'allure de la fonction d'autocorrélation.

Si l'on considère l'évolution du signal de fluorescence au cours du temps,  $F(t)$ , comme assimilable à un processus stochastique stationnaire<sup>23</sup>, la fonction d'autocorrélation norma-

comptage de photons (PCH) ou d'analyse de distribution de l'intensité de fluorescence (FIDA).

<sup>22</sup>On notera que  $G(\tau)$  est la fonction d'autocorrélation normalisée du signal de fluorescence.

<sup>23</sup>C'est un processus aléatoire (stochastique) dont les propriétés statistiques ne changent pas au cours du temps (stationnarité).

lisée,  $G(\tau)$ , qui traduit les similitudes entre le signal brut,  $F(t)$ , à un instant  $t$  et une copie de ce même signal à un instant  $t + \tau$ ,  $F(t + \tau)$ , se définit comme suit [172] :

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(0) \delta F(\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 = G_N(\tau) + 1 \quad (3.1)$$

$\langle \rangle$  représente la valeur moyenne sur la durée de l'expérience,  $F(t)$  est le signal de fluorescence et  $\delta F(t)$  qui correspond aux fluctuations temporelles du signal de fluorescence, est défini comme l'écart à la valeur moyenne temporelle, tel que  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ .

Plus concrètement, le signal  $F(t)$  peut s'écrire [133] [116] :

– pour une excitation monophotonique :

$$F^{1ph}(t) = \eta_D I_0 \int_V S_{1ph}(\underline{r}) \cdot CEF^{1ph}(\underline{r}) \cdot (\phi_f(t) \sigma_a^{1ph}(t) C(\underline{r}, t)) dV \quad (3.2(a))$$

– pour une excitation biphotonique :

$$F^{2ph}(t) = \frac{1}{2} \eta_D g_2 I_0^2 \int_V S_{2ph}^2(\underline{r}) \cdot CEF^{2ph}(\underline{r}) \cdot (\phi_f(t) \sigma_a^{2ph}(t) C(\underline{r}, t)) dV \quad (3.2(b))$$

Avec :

-  $(\phi_f \sigma_a^{1ph} C(\underline{r}, t))$  et  $(\phi_f \sigma_a^{2ph} C(\underline{r}, t))$  la partie reflétant les fluctuations temporelles du signal à un et deux photons, où  $\phi_f(t)$  est l'efficacité quantique de fluorescence,  $\sigma_a^{1ph}(t)$  et  $\sigma_a^{2ph}(t)$  sont respectivement les sections efficaces d'absorption à un et deux photons, et  $C(\underline{r}, t)$  est la concentration locale en molécules fluorescentes à la position  $(\underline{r})$  et à un instant  $t$  ;

-  $\eta_D$  l'efficacité de détection du système ;  $I_0$  l'intensité moyenne au point focal ;

-  $g_2 = \frac{g_p}{\tau f}$  un terme traduisant la cohérence temporelle de l'excitation, où  $g_p$  est un paramètre sans dimension qui traduit la forme de l'impulsion,  $\tau$  est la durée de l'impulsion et  $f$  la fréquence de répétition des impulsions ;

-  $S_{1ph}(\underline{r})$  et  $S_{2ph}(\underline{r})$  la distribution spatiale normalisée de l'énergie d'excitation, à un et deux photons, dans le plan de l'échantillon,  $S_{1ou2ph}(\underline{r}) = \frac{I(\underline{r})}{I(0)}$  ;

-  $CEF^{1ph}(\underline{r})$ ,  $CEF^{2ph}(\underline{r})$  l'efficacité normalisée de collection spatiale, à un et deux photons (sans dimension), dépendant des propriétés de transmission de l'objectif et du trou de filtrage.

On notera que pour une excitation à deux photons la présence du trou de filtrage est superflue

et donc on peut écrire  $CEF^{2ph}(\underline{r}) = 1$ .

Le signal mesuré est donc lié à la dynamique de diffusion à travers le terme de concentration,  $C(\underline{r}, t)$ , ainsi qu'à la dynamique interne de la molécule qui peut subir des processus physico-chimiques (reconformation réaction chimique, passage dans l'état triplet, photoblanchiment, etc) à travers les facteurs  $\phi_f(t)$  et  $\sigma_a(t)$ , caractéristiques de la brillance de la molécule.

Afin d'homogénéiser les notations par rapport à celles du chapitre 2 paragraphe 3.4.4, nous regrouperons les termes  $S_{1ph}(\underline{r}).CEF^{1ph}(\underline{r})$  (respectivement  $S_{2ph}^2(\underline{r}).CEF^{2ph}(\underline{r})$ ) sous la forme d'une seule fonction notée  $W^{1ph}(\underline{r})$  ( $W^{2ph}(\underline{r})$ ) qui représente la distribution spatiale du rayonnement détecté suite à une excitation monophotonique (respectivement biphotonique).

### 4.2.3 Modélisation de la diffusion en FCS

Si l'on considère une intensité excitatrice constante et une molécule subissant un processus de diffusion pure (aucun processus chimique ni reconformation ne modifie les propriétés physico-chimiques de la molécule) de sorte que seules les fluctuations de la concentration soient à prendre en compte, on peut remplacer  $\delta(\phi_f\sigma_a C(\underline{r}, t))$  par  $\phi_f\sigma_a\delta(C(\underline{r}, t))$  dans les équations 3.2(a) et 3.2(b). En combinant les relations 3.1 et 3.2(a), on peut réécrire la fonction d'autocorrélation sous la forme [134] :

$$G(\tau) = G_N(\tau) + 1 = \frac{\iint W(\underline{r})W(\underline{r}') \langle \delta C(\underline{r}, 0)\delta C(\underline{r}', \tau) \rangle dV dV'}{\langle C \rangle \int W(\underline{r})dV} + 1 \quad (3.3)$$

où  $\langle \delta C(\underline{r}, 0)\delta C(\underline{r}', \tau) \rangle$  traduit la corrélation qui existe entre les fluctuations de concentration  $\delta C(\underline{r}', \tau)$  à la position  $\underline{r}'$  à l'instant  $t = \tau$ , et les fluctuations  $\delta C(\underline{r}, 0)$  à l'instant  $t = 0$  et à la position  $\underline{r}$ .

À un processus de diffusion pure (mouvement brownien) dans un volume (diffusion 3D), correspond l'expression :

$$\langle \delta C(\underline{r}, 0)\delta C(\underline{r}', \tau) \rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D\tau)^{-\frac{3}{2}}} e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}}$$

En utilisant la définition du volume focal,  $V_{eff}$ , considéré comme gaussien-gaussien, donnée

par l'eq. 2.29, on en déduit l'expression suivante de  $G(\tau)$  :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_r}{\omega_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} = 1 + G_D(\tau) \quad (3.4(a))$$

Si la molécule diffuse librement (mouvement brownien) sur une surface (diffusion 2D), alors 3.4(a) devient :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \quad (3.4(b))$$

Dans les équations 3.4(a) et 3.4(b)  $\omega_r, \omega_z$  sont respectivement les dimensions (rayons) du faisceau d'excitation à  $1/e^2$  dans les directions latérale et axiale,  $\langle C \rangle$  est la valeur moyenne de la concentration en molécules fluorescentes dans le volume focal  $V_{eff}$  et  $\tau_D$  est le temps moyen de diffusion de la molécule à travers le volume focal [38], tel que :

$$\text{Pour une excitation à un photon : } \tau_D^{1ph} = \frac{\omega_{r-1ph}^2}{4D} \quad (3.5(a))$$

$$\text{Pour une excitation à deux photons : } \tau_D^{2ph} = \frac{\omega_{r-2ph}^2}{8D} \quad (3.5(b))$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion de la molécule en question dans le milieu, donné par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k.T}{6\pi \cdot \eta_\nu \cdot R_h} \quad (3.6)$$

avec  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température du milieu,  $\eta_\nu$  la viscosité du milieu et  $R_h$  le rayon hydrodynamique de la molécule.

On remarque que le temps de diffusion à deux photons est deux fois plus court pour une même taille de waist du faisceau exciteur, car, le processus étant biphotonique, la zone d'excitation efficace a une dimension latérale (rayon) plus faible d'un facteur  $\sqrt{2}$ .

On notera  $G(0)$  la valeur de la fonction d'autocorrélation à  $\tau = 0$ , tel que :  $G(0) = 1 + \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} = 1 + G_D(0)$ . L'entrée et la sortie des molécules dans le volume d'observation suit en général un processus aléatoire décrit par une loi poissonnienne telle que  $\langle F(t) \rangle \propto \langle N \rangle$  et  $\langle \delta F(t)^2 \rangle \propto N$ , d'où  $G_D(0) \propto \frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \propto \frac{1}{\langle N \rangle}$ .  $G(0)$  est donc relié à  $\langle N \rangle$ , valeur moyenne du nombre de molécules dans le volume focal, par la relation suivante, valable si l'on néglige le

bruit :

$$G(0) = 1 + G_D(0) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (3.7(a))$$

En réalité, en présence de bruit de fond, le nombre de molécules déduit de cette formule n'est pas égal au nombre moyen réel de molécules physiquement présentes dans le volume focal. En effet, en tenant compte de l'impact du bruit sur le signal, on peut transformer l'équation 3.1 comme suit :

$$G_N(\tau) = G(\tau) - 1 = \frac{\langle F(t) F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1 = \frac{\langle (F_m(t) + B(t)) (F_m(t+\tau) + B(t+\tau)) \rangle}{\langle F_m(t) + B(t) \rangle^2} - 1$$

où  $F_m(t)$  est le signal de fluorescence de la molécule étudiée et  $B(t)$  est le bruit parasite.  $F_m(t)$  et  $B(t)$  sont de façon très générale décorrélés. En général,  $B(t)$  est assimilable à un bruit blanc sur les échelles de temps considérées et donc  $\langle B(t)B(t+\tau) \rangle = B^2$  et  $\langle B(t) \rangle = B$ . D'où :

$$G_N(\tau) = \frac{\langle F_m(t) F_m(t+\tau) \rangle + 2 \langle F_m(t) \rangle B + B^2}{(\langle F_m(t) \rangle + B)^2} - 1 = G_m(\tau) \frac{\langle F_m(t) \rangle^2}{(\langle F_m(t) \rangle + B)^2} \quad (3.7(b))$$

$$\text{avec } G_m(\tau) = \frac{\langle F_m(t) F_m(t+\tau) \rangle}{\langle F_m(t) \rangle^2} - 1.$$

En adoptant les notations simplifiées suivantes :  $\langle F_m(t) \rangle = \langle S_u \rangle$ , signal utile, et  $(\langle F_m(t) \rangle + B) = \langle S_t \rangle$ , signal total, et en utilisant la relation 3.7(a), on obtient :

$$G_N(0) = \frac{\langle S_u \rangle^2}{\langle S_t \rangle^2} \cdot \frac{1}{\langle N_{réel} \rangle} \quad (3.7(c))$$

où,  $\langle N_{réel} \rangle$  correspond au nombre moyen de molécules d'intérêt physiquement présentes dans le volume focal.

#### 4.2.4 Modélisation plus complète des différentes contributions.

En réalité, dans la quasi-totalité des expériences de FCS, outre la diffusion, il est nécessaire de considérer les processus de photoblanchiment et tous ceux pouvant être à l'origine d'un phénomène de clignotement, tels que le passage dans l'état triplet, une réaction faisant intervenir le fluorophore et modifiant ses propriétés de fluorescence, ou encore une reconformation. L'omission de ces phénomènes peut être critique, puisqu'ils modifient la concentration appa-

rente en fluorophores, ainsi que le profil de la courbe d'autocorrélation (cf. Figure 16) qui ne peut plus être décrite par l'expression 3.1. Si les autres phénomènes, modifiant les propriétés de fluorescence de la molécule étudiée, ne modifient pas ses propriétés de diffusion, alors cette dernière devient [40] :

$$G(\tau) = 1 + G_C(\tau)G_D(\tau) \quad (3.8)$$

Où  $G_c(\tau)$  est un terme rendant compte des différents phénomènes à l'origine d'une variation du signal détecté, dépendant des différentes constantes réactionnelles des événements considérés et  $G_D$ , définie par l'équation 3.4(a), correspond au terme de modélisation de la diffusion. On peut exprimer simplement  $G_c$  en étudiant séparément les différents processus influents.

Si l'on observe uniquement l'effet d'une réaction chimique transformant un corps N peu fluorescent, en un corps B très fluorescent, telle que  $N + X \xrightleftharpoons[k_{off}]{k_{on}} B$  [77], caractérisée par son temps de relaxation chimique  $\tau_c = (k_{on} + k_{off})^{-1}$  (tel que  $\tau_c \ll \tau_D$ ) et ses constantes chimiques<sup>24</sup> d'association  $k_{on}$  et de dissociation  $k_{off}$ , alors on peut déduire l'expression décrivant la courbe de corrélation correspondante, à partir des probabilités  $p_N$  et  $p_B$  de trouver la molécule dans chacun des deux états, et telles que  $p_B + p_N = 1$ . Le calcul des probabilités se fait en résolvant le système décrivant les taux de transition entre les états N et B de la molécule :

$$\begin{aligned} \frac{dp_B}{d\tau} &= k_{on}p_N - k_{off}p_B \\ \frac{dp_N}{d\tau} &= k_{off}p_B - k_{on}p_N \end{aligned} \quad (3.9)$$

Ceci nous conduit aux probabilités conditionnelles définies :

– pour une molécule initialement dans l'état B, à laquelle on associe la probabilité  $p_B^0 = k_{off}\tau_c$  :

$$\begin{aligned} p_{B/B}(\tau) &= k_{off}\tau_c + (1 - k_{off}\tau_c)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} = p_B^0 + (1 - p_B^0)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} \\ p_{N/B}(\tau) &= (1 - k_{off}\tau_c)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) = (1 - p_B^0)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) \end{aligned} \quad (3.10(a))$$

<sup>24</sup>Les constantes de l'équilibre dynamique chimique  $k_{on} = k' \cdot [X]_{libre}$  et  $k_{off}$ , exprimées ainsi, sont homogènes à des  $s^{-1}$ . Cependant, on notera que suivant le formalisme choisi, on utilisera tantôt  $k_{on}$ , tantôt  $k'$  exprimé en  $s^{-1}M^{-1}$ .

– pour une molécule initialement dans l'état N, à laquelle on associe la probabilité  $p_N^0 = k_{on}\tau_c$

$$\begin{aligned} p_{B/N}(\tau) &= (1 - k_{on}\tau_c)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) = (1 - p_N^0)(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}) \\ p_{N/N}(\tau) &= k_{on}\tau_c + (1 - k_{on}\tau_c)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} = p_N^0 + (1 - p_N^0)e^{-\frac{\tau}{\tau_c}} \end{aligned} \quad (3.10(b))$$

À partir de ces dernières et des équations 3.1 et 3.8, on peut écrire l'expression de la fonction d'autocorrélation chimique  $G_c^{RC}$  :

$$\begin{aligned} G_c^{RC}(\tau) &= \frac{\langle \delta F_{RC}(0)\delta F_{RC}(\tau) \rangle}{\langle \delta F_{RC}(\tau) \rangle^2} \\ \text{avec } \langle \delta F_{RC}(0)\delta F_{RC}(\tau) \rangle &= \eta_B p_B^0 [\eta_B p_{B/B}(\tau) + \eta_N p_{N/B}(\tau)] + \eta_N p_N^0 [\eta_B p_{B/N}(\tau) + \eta_N p_{N/N}(\tau)] \\ \text{et } \langle \delta F_{RC}(\tau) \rangle^2 &= (\eta_B p_B^0 + \eta_N p_N^0)^2 \end{aligned} \quad (3.11)$$

Les grandeurs  $\eta_B$  et  $\eta_N$  caractérisent respectivement l'efficacité de fluorescence des états B et N de la molécule.

Ainsi, à partir de l'équation 3.11, on obtient, après quelques simplifications, l'expression de  $G_c^{RC}(\tau)$  en fonction des paramètres  $\tau_c$ ,  $k_{on}$  et  $k_{off}$  :

$$G_c^{RC}(\tau) = 1 + \frac{F_c}{1 - F_c} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_c}\right) = 1 + p \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_c}\right) \quad (3.12(a))$$

Avec :

$$\begin{aligned} F_c &= \frac{k_{on}k_{off}(\eta_N - \eta_B)^2}{(k_{on} + k_{off})(k_{on}\eta_N^2 + k_{off}\eta_B^2)} \\ p &= \frac{k_{on}k_{off}(\eta_N - \eta_B)^2}{(k_{on}\eta_N + k_{off}\eta_B)^2} \\ \tau_c &= (k_{on} + k_{off})^{-1} \end{aligned} \quad (3.13)$$

Lorsque la fluorescence de l'état noir est négligeable,  $\eta_N = 0$ , alors  $F_c$  s'identifie à la fraction moyenne de molécules dans l'état B et  $p$  à la constante d'équilibre chimique.

On peut appliquer le même raisonnement pour modéliser l'effet de la conversion singulet-triplet, ce qui conduit à l'expression de  $G_c^{ISC}$  donnée par l'égalité suivante :

$$G_c^{ISC}(\tau) = 1 + \frac{T}{1 - T} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right) \quad (3.12(b))$$

Où  $\tau_T$  est la durée de vie de l'état triplet et T est la fraction moyenne de fluorophores

dans l'état triplet pour un pseudo système à trois niveaux  $(S_1, S_2, T)$ , telle que :

$$T = \frac{k_{S_1 S_2} \cdot k_{S_2 T}}{k_{S_1 S_2} (k_{S_2 T} + k_{T S_1}) + k_{S_2 S_1} \cdot k_{T S_1}}$$

On peut également faire de même avec le photoblanchiment pour lequel  $G_c^B$  s'écrit :

$$G_c^B(\tau) = \frac{1}{1-A} [1 - \exp(-k_B \tau)] \quad (3.12(c))$$

Où  $A$  correspond à la fraction de molécules photoblanchies parmi toutes les molécules excitées du volume focal, et  $k_B$  est le taux de photoblanchiment.

Enfin, si  $m$  processus indépendants interviennent, on écrit  $G_c(\tau)$  comme le produit des différentes contributions<sup>25</sup> [64] :

$$G_c(\tau) = \prod_{i=1}^m \left[ 1 + \frac{F_i}{1 - F_i} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_i}\right) \right] \quad (3.12(d))$$

Où  $F_i$  et  $\tau_i$  sont les amplitudes et temps caractéristiques du processus  $i$ , définissant la dynamique temporelle de celui-ci.

En théorie, les échelles de temps accessibles en FCS correspondent à une large plage représentée sur la figure 16, allant du dégroupement de photons à la diffusion libre. En pratique, l'étude du phénomène du dégroupement de photons et celle de la diffusion font appel en général à des méthodes différentes. Le dégroupement qui décrit l'impossibilité qu'un fluorophore, ayant émis un photon à l'instant  $t=0$ , réémette un photon à un instant  $t$  ultérieur si  $t$  est petit devant le temps de repompage de la molécule vers l'état excité, a un temps caractéristique de l'ordre de quelques nanosecondes et est mesuré par des techniques du type "start-stop" entre photons successifs. La diffusion avec un temps caractéristique de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de microsecondes est mesurée en général soit par échantillonnage de l'intensité de fluorescence soit en enregistrant les temps d'arrivée de chaque photon à partir d'une horloge. Cette dernière technique atteint maintenant une résolution d'une à quelques dizaines de nanosecondes et permet également de suivre d'autres processus tels que la conversion interne vers l'état triplet, le photoblanchiment, la rotation de

<sup>25</sup>Suivant les vitesses des différents processus pris en compte on pourra, dans certains cas, effectuer des approximations ou même les considérer séparément [40].

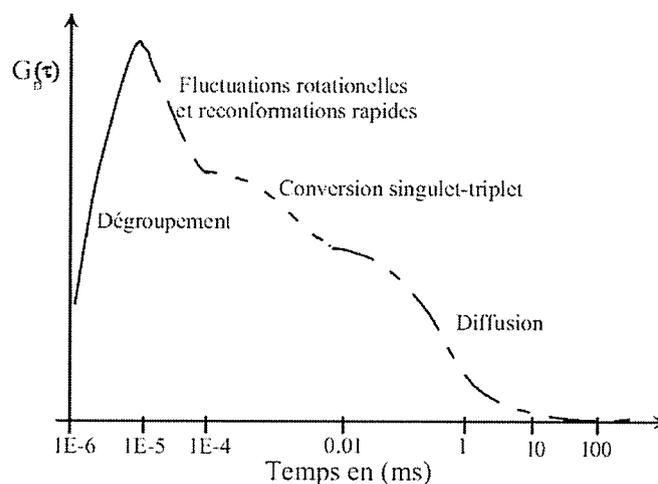


FIG. 16 – Exemple d'allure de courbe d'autocorrélation mettant en jeu différents processus. On notera bien que les échelles temporelles sont données à titre indicatif et que les ordres de grandeurs des durées caractéristiques peuvent être très différents suivant le milieu et les acteurs considérés.

macromolécules, les réactions chimiques... D'autre part, les événements, dont la dynamique temporelle excède le temps de diffusion moyen à travers le volume focal, ne seront pas résolus par FCS.

Outre les différents phénomènes à prendre en compte, il est parfois nécessaire de considérer plusieurs ( $n$ ) espèces fluorescentes indépendantes, contribuant au signal d'autocorrélation. Dans ce cas on écrira la relation 3.1 comme suit [64] :

$$G(\tau) = \frac{\sum_{i=1}^n \overline{F}_i^2 \cdot G_i(\tau)}{\sum_{i=1}^n \overline{F}_i^2} \quad (3.14)$$

Où  $\overline{F}_i$  et  $G_i(\tau)$  correspondent respectivement à la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence et à la fonction d'autocorrélation de l'espèce  $i$ .

## 5 Système étudié et montage expérimental

Pour pouvoir étudier une réaction chimique, il est indispensable de s'assurer que l'échelle des temps accessibles dans notre étude englobe celle caractérisant la dynamique chimique d'intérêt. C'est, d'une part, la composition des échantillons et, d'autre part, le système optique qui déterminent l'échelle de temps à laquelle nous aurons accès. Par ailleurs, les propriétés de fluorescence d'une sonde photochimique comme celle que l'on étudie sont intimement liées à la composition du milieu dans lequel elle évolue et à l'excitation. Dans cette partie, après avoir présenté un peu plus en détail la molécule étudiée, je présenterai les conditions choisies pour le système optique et la préparation des échantillons.

### 5.1 La sonde calcique

La sonde calcique que j'ai étudiée au cours de mes travaux de thèse est l'Oregon Green Bapta 5N. Comme son nom l'indique l'Oregon Green 488 BAPTA-5N (OrgBapta5N) est constitué de trois parties : l'Oregon Green 488 qui lui confère ses propriétés de fluorescence, un groupement amide (N-C=O) qui joue le rôle de connecteur et le Bapta qui est un chélateur du calcium (cf. Figure 17). La molécule de BAPTA ((1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) capable de chélater une molécule de calcium, via ses quatre groupements carboxylates ( $\text{COO}^-$ ), possède une structure très similaire à celle de l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) (cf. Figure 18). Cependant, elle présente une sélectivité accrue pour le calcium, par rapport à l'EDTA qui complexe de nombreux cations métalliques, et est dotée de deux groupements phényles qui lui confèrent une sensibilité moindre au pH. Les propriétés de fluorescence du système fluorophore-connecteur-chélateur dépendent dans le cas de l'OrgBapta5N de la présence de l'ion Calcium. En absence de ce dernier, la molécule est dite libre et la fluorescence est bloquée par un transfert électronique photo-induit (PET) [157] [141] entre le fluorophore excité et le chélateur (cf. Figure 19). Par analogie avec la molécule de calcium green très proche de l'OrgBapta5N, étudiée par l'équipe de Robert B. Pansu [130] [151], on peut penser que le transfert électronique ne s'effectue pas via la liaison amide entre le Bapta et le fluorophore mais, très probablement, directement par un transfert électronique statique entre les deux groupements impliqués, la molécule étant en conformation repliée et ces deux groupements étant proches l'un de l'autre. En effet, ces auteurs ont montré, en étudiant l'effet

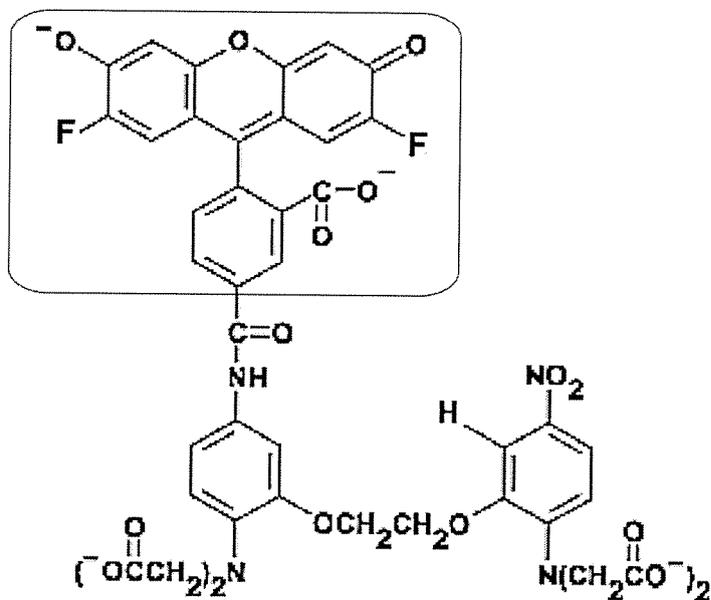


FIG. 17 – La molécule d’Oregon Green BAPTA 5N.

Elle est constituée d’une molécule d’Oregon Green 488 (encadrée), liée à une molécule de BAPTA-5N par un groupement amide.

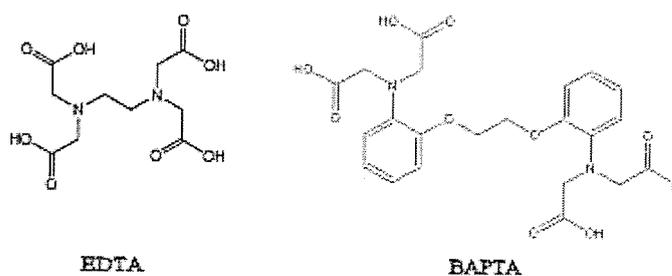


FIG. 18 – Comparaison des structures moléculaires de l’EDTA et du BAPTA

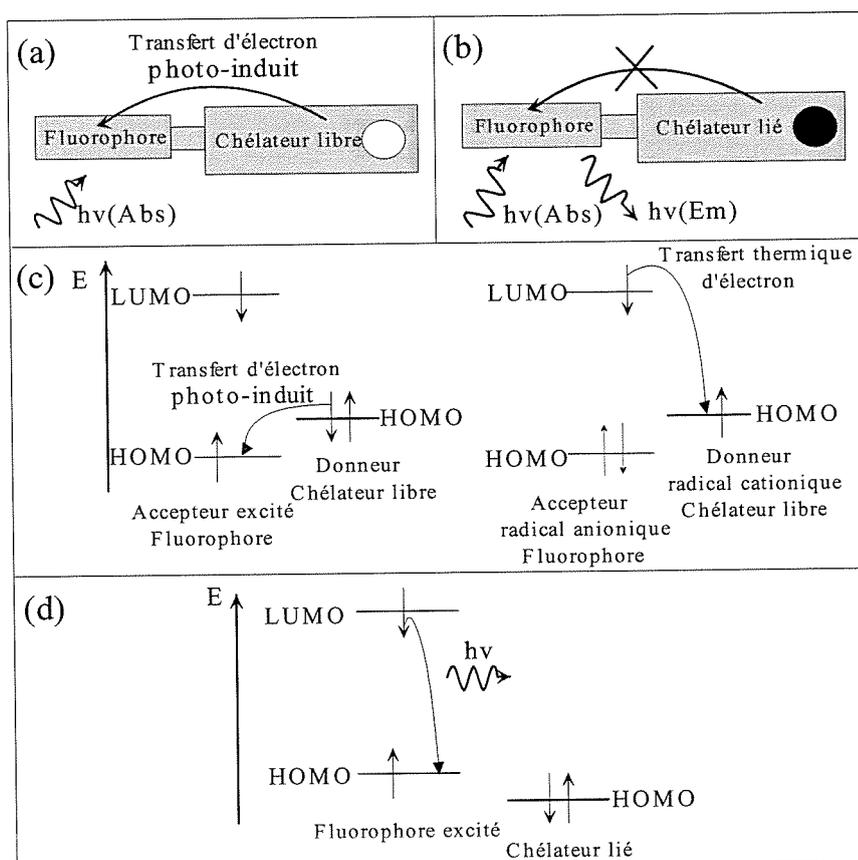


FIG. 19 – Principe du transfert d'électron photoinduit (PET) dans un système fluorophore-connecteur-chélateur.

(a) et (c) présentent respectivement un schéma du système libre et le diagramme d'énergie correspondant. (b) et (d) présentent un schéma du système dans l'état complexé ainsi que le diagramme d'énergie correspondant.

de la viscosité et de l'adsorption de la molécule sur des protéines, que le transfert électronique et donc l'inhibition de la fluorescence n'impliquait pas une reconformation dynamique de la molécule et que ce transfert n'avait plus lieu si on perturbait la conformation de la molécule par adsorption. La complexation d'un ion calcium par le chélateur induit un déplacement du niveau HOMO donneur, vers les énergies plus basses, bloquant ainsi le transfert d'électron vers le niveau fondamental du fluorophore. La désexcitation radiative du fluorophore est alors de nouveau possible. Le maximum d'absorption de la molécule d'OrgBapta5N se situe à  $494nm$  et le maximum d'émission à  $521nm$  (cf. Figure 20). On utilisera donc, dans la pratique, la bande d'émission d'un laser à Argon à  $488nm$  pour réaliser l'excitation à un photon et un laser Titane Saphir femtoseconde, accordable sur la bande  $750 - 850nm$ , pour l'excitation biphotonique.

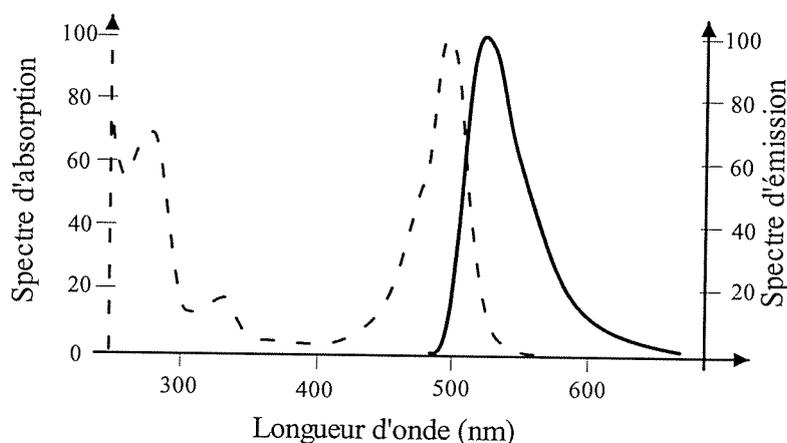
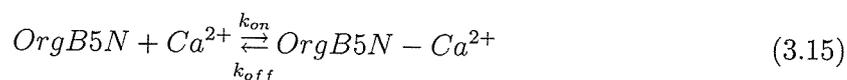


FIG. 20 – Spectres d'absorption et d'émission de l'Oregon Green BAPTA 5N.

La réaction chimique entre l'OrgBapta5N,  $OrgB5N$ , et l'ion calcium,  $Ca^{2+}$ , s'écrit ainsi :



Elle est caractérisée, en premier lieu, par sa constante de dissociation,  $K_d$ , exprimée en M (molaire ou moles par litre), telle que :

$$K_d = \frac{[Ca^{2+}][OrgB5N]}{[OrgB5N - Ca^{2+}]} \quad (3.16)$$

où  $[X]$  représente la concentration du composé  $X$ , à l'équilibre, exprimée en M.

Au point d'équilibre, lorsque  $[OrgB5N] = [OrgB5N - Ca^{2+}]$ , on obtient l'égalité  $K_d = [Ca^{2+}]_{eq}$ . Le fournisseur (*Invitrogen*) [62] évalue cette constante à :  $K_d^{th} = 20\mu M$ . Cependant, suivant les conditions expérimentales (température, pH, force ionique, viscosité, présence d'autres ions en solution, ...), cette valeur peut varier typiquement entre 20 et 90  $\mu M$  [160].

Afin de caractériser la cinétique de l'équilibre dynamique de complexation décomplexation, on définit  $k_{on}$ , respectivement  $k_{off}$ , exprimés en  $s^{-1}$ , comme le taux de transition de la molécule d'un état "noir", très faiblement fluorescent, dans lequel la fluorescence est majoritairement bloquée par PET, vers un état brillant, respectivement d'un état brillant vers un état "noir". On exprime  $k_{off}$  le plus souvent sous la forme  $k_{off} = \frac{1}{\tau_{OrgB5N-Ca^{2+}}} = \frac{1}{\tau_B}$  qui correspond à l'inverse du temps de vie du complexe fluorescent  $\tau_{OrgB5N-Ca^{2+}}$  que je désignerai également par temps brillant  $\tau_B$  (du fait de l'émission de fluorescence). On peut le considérer comme indépendant de la concentration calcique.  $k_{on}$ , quant à lui, correspond à l'inverse du temps noir  $\tau_N$  ou inverse du temps moyen nécessaire à la molécule pour complexer une molécule de calcium :  $k_{on} = \frac{1}{\tau_N} = \alpha [Ca^{2+}]_{libre}$ , où  $\alpha$  est une constante spécifique de la sonde considérée.

## 5.2 Composition des échantillons

### 5.2.1 Paramètres contrôlés lors de la préparation des échantillons

Des expériences préliminaires ont permis de déterminer les différents constituants des échantillons. Ce bref paragraphe a pour objet de décrire cette composition, ainsi que les paramètres que nous avons contrôlés.

Les premières expériences que j'ai effectuées m'ont conduite à préparer une solution composée des réactifs suivants, dans les proportions indiquées :  $CaCl_2$  à  $180\mu M$ ,  $KCl$  à  $144mM$ ,  $OrgBapta5N$  à  $2.10^{-8}M$ , glycérol à hauteur de 60% en masse et  $EDTA$  en concentration variable (entre 0 et  $300\mu M$ ). Dans ces échantillons, nous avons fait en sorte d'obtenir un pH de 8, par ajout d'un tampon pH, TrisHCl de pH=8, en concentration 3mM, une force ionique de 145 mM, et une viscosité de  $10mPa.s$ . Le contrôle de la concentration en calcium libre est effectué grâce à l'ajustement de la concentration en EDTA. Les proportions nécessaires ont été déterminées par titrage, comme nous allons le voir.

### 5.2.2 Contrôle du pH

Le BAPTA présentant des propriétés acido-basiques sa protonation affecte ses propriétés de complexation du calcium [130]. De la même façon, la fluorescence de la molécule d'Oregon Green 488 est influencée par le pH (comme on peut le voir en se rendant sur le site d'Invitrogen, <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0495.html>). Il est de ce fait nécessaire de se placer dans une configuration favorable en termes de pH afin de ne pas détériorer les propriétés de la sonde. Pour des valeurs de pH comprises entre 7 et 9, l'émission de fluorescence de l'Oregon Green 488 ne présentant plus de dépendance au pH et le BAPTA étant sous sa forme basique (configuration favorable), nous avons choisi de travailler à pH 8. L'obtention de telles solutions a initialement été réalisée par ajout de NaOH concentré, puis en se plaçant dans un tampon de pH TrisHCl de pH=8 (3mM).

### 5.2.3 Contrôle de la concentration calcique

Nous souhaitons caractériser une sonde calcique dont la zone de sensibilité correspond à des concentrations calciques faibles (comprises entre 0 et  $200\mu M$ ), qu'il nous faut maîtriser. Or, à cette échelle, il est très difficile de faire varier la concentration calcique de la solution par simple modification de la quantité de  $CaCl_2$  introduite dans les échantillons à cause du calcium résiduel qui atteint facilement quelques dizaines de micromolaires. Il nous avait semblé judicieux, dans un premier temps, d'utiliser un tampon calcique à base d'EGTA pour contourner ce problème, mais celui-ci perturbait la mesure des constantes caractéristiques de la dynamique chimique, du fait de l'échange direct de calcium qui s'instaurait entre la molécule tampon et celle étudiée. Il nous a été indispensable de mettre au point une autre méthode permettant de contrôler la quantité de calcium libre présente dans les échantillons.

L'une des difficultés principales est le calcium résiduel présent dans la plupart des sources d'eau ou réintroduit par la verrerie. En effet, même dans de l'eau doublement désionisée, nous avons mesuré une concentration calcique d'environ  $50\mu M$ . Pour remédier à ce problème, nous avons eu recours à une double distillation de l'eau qui nous a permis, non seulement, de diminuer la concentration calcique initiale, mais aussi, de réduire la quantité d'autres ions ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , ...) pouvant potentiellement être chélatés par l'OrgBapta5N et l'EDTA.

La verrerie de laboratoire, comme les lamelles utilisées constituent également une source

d'ions comme le calcium et le magnésium. Nous avons donc décidé de ne travailler qu'avec des récipients en plastique ne libérant pas d'ions et surtout nous avons introduit, dans la composition de nos échantillons, un autre chélateur du calcium présentant une constante de dissociation beaucoup plus faible que celle de l'OrgBapta5N : l'EDTA.

L'EDTA est un ligand hexadendate comportant quatre groupements carboxyles et deux groupements amines (cf. Figure 18), susceptibles d'être déprotonés, l'espèce complexante en question étant  $Y^{4-}$ . Du fait de sa structure, l'EDTA est très sensible au pH, et la stabilité des complexes qu'il forme décroît lorsque le pH diminue. Pour déterminer les conditions favorables à notre expérience, nous nous sommes reportés aux études déjà existantes [121][56] sur la relation entre pH et propriétés de chélation de l'EDTA. Selon ces travaux, au-delà de pH 7,5 la proportion de molécules dont les six groupements sont déprotonés, commence à devenir significative ( $Kd$  cent fois plus faible qu'à pH 6,5). Cette dernière forme,  $Y^{4-}$ , complexée avec un cation (type  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ ) est la plus stable. Ainsi, pour des valeurs de pH situées autour de 8, on prédit une valeur de la constante de dissociation effective  $Kd'$  de quelques nanomolaires à quelques dizaines de nanomolaires<sup>26</sup>, à comparer avec celui de l'OrgBapta5N qui, d'après le fabricant (Invitrogen [62]), doit se trouver aux alentours de  $20\mu M$  (pour une solution de pH 7,2 à  $22^\circ C$ ) et qui, comme nous l'avons déjà souligné, peut aller de la dizaine à la centaine de micromolaires. Ces résultats nous ont amenés à travailler aux alentours de pH=8, ce qui constitue, une configuration favorable à la fois pour l'EDTA et pour la compatibilité biologique des échantillons

Il est également nécessaire de déterminer la gamme de concentration d'EDTA à utiliser afin de contrôler la quantité de calcium libre dans nos échantillons. Pour ce faire, nous avons effectué une expérience de titrage du calcium par l'EDTA.

Celle-ci consiste à quantifier les variations de fluorescence correspondant aux changements de la concentration en calcium libre  $[Ca^{2+}]_{libre}$  dans la solution. Pour réaliser ce titrage, nous avons utilisé des échantillons dont la composition est la suivante :  $[KCl] = 144mM$ ,

<sup>26</sup>On relie la constante de dissociation effective  $Kd'$  à la constante de dissociation  $Kd$  par la relation suivante :

$$\frac{Kd'}{Kd} = 1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2 + K_1K_2K_3[H^+]^3 + K_1K_2K_3K_4[H^+]^4 + K_1K_2K_3K_4K_5[H^+]^5 + K_1K_2K_3K_4K_5K_6[H^+]^6$$

Où  $K_1, K_2, K_3, K_4, K_5, K_6$  sont les constantes de protonation de l'EDTA, et  $Kd$ , fonction des concentrations à l'équilibre, s'écrit :  $Kd = \frac{[EDTA]_{eq}[Ca^{2+}]_{eq}}{[Ca^{2+}-EDTA]_{eq}}$ .

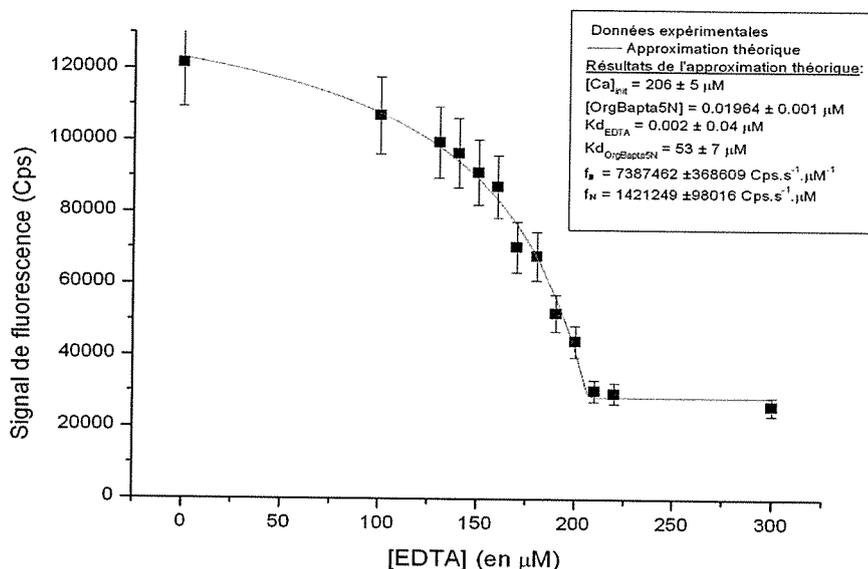


FIG. 21 – Titrage de l'OrgBapta5N par l'EDTA.

$[CaCl_2] = 180 \mu M$ ,  $[Org]_{init} = 2.10^{-8} M$ ,  $[EDTA] = \{0, 100, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 300\} \mu M$  dans une solution d'eau doublement distillée-glycérol à 60% en masse, conférant à la solution une viscosité d'environ  $10 mPa.s$ , tamponnée par une solution de TrisHCl de pH=8 (3mM) afin d'obtenir un pH autour de 8. Pour cette expérience, nous avons travaillé avec une puissance d'environ  $140 \pm 5 \mu W$  à l'entrée du microscope (soit  $25 \mu W$  sur l'échantillon).

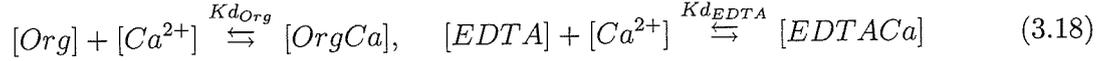
Nous avons ensuite effectué la mesure du nombre moyen de coups par seconde, émis par chacune des différentes solutions et tracé l'allure de l'évolution du signal en fonction de la concentration en EDTA (cf. Figure 21). Le signal détecté dépend, d'une part, de la concentration en OrgBapta5N complexés,  $[OrgCa]_{eq}$ , à l'équilibre, et d'autre part, de la concentration en  $[Org]_{eq}$  à l'équilibre, selon la relation :

$$S_f = f_B [OrgCa]_{eq} + f_N [Org]_{eq} = f_B [OrgCa]_{eq} + f_N ([Org]_{init} - [OrgCa]_{eq}) \quad (3.17)$$

Avec  $f_B$  et  $f_N$  les coefficients reflétant les contributions respectives des états complexés et non complexés de l'OrgBapta5N au signal de fluorescence. Dans cette relation, comme dans

toutes celles qui vont suivre, les indices *eq* et *init* désignent les concentrations à l'équilibre et les concentrations initiales.

Afin de déterminer ces concentrations à l'équilibre, il est nécessaire de tenir compte des deux équilibres réactionnels en présence :



Avec  $Kd_{Org} = \frac{[Org]_{eq} \times [Ca^{2+}]_{eq}}{[OrgCa]_{eq}}$  et  $Kd_{EDTA} = \frac{[EDTA]_{eq} \times [Ca^{2+}]_{eq}}{[EDTACa]_{eq}}$ , où les différentes concentrations correspondent à celles en vigueur à l'équilibre chimique.

À partir de ces deux relations, on peut écrire le système suivant :

$$\begin{aligned} Kd_{Org}[OrgCa]_{init} &= ([Org]_{init} - [OrgCa]_{eq})([Ca^{2+}]_{init} - [OrgCa]_{eq} - [EDTACa]_{eq}) \\ Kd_{EDTA}[EDTACa]_{init} &= ([EDTA]_{init} - [EDTACa]_{eq})([Ca^{2+}]_{init} \\ &\quad - [OrgCa]_{eq} - [EDTACa]_{eq}) \end{aligned} \quad (3.19)$$

La résolution du système ??, détaillée dans l'annexe 1, nous amène au résultat suivant :

$$\begin{aligned} [OrgCa]_{eq} &= \frac{A \pm \sqrt{A^2 - 4[Org]_{init}([Ca^{2+}]_{init} - [EDTACa]_{eq})}}{2} \\ [EDTACa]_{eq} &= \frac{B \pm \sqrt{B^2 - 4[EDTA]_{init}[Ca^{2+}]_{init}}}{2} \end{aligned} \quad (3.20)$$

Avec  $A = [Ca^{2+}]_{init} + Kd_{Org} - [EDTACa]_{eq}$  et  $B = [EDTA]_{init} + [Ca^{2+}]_{init} + Kd_{EDTA} - [OrgCa]_{eq}$

En combinant les relations 3.17 et 3.20, on peut relier les variations du signal de fluorescence avec les variations de la concentration en EDTA (donc indirectement avec les variations de la concentration calcique). L'ajustement de la courbe expérimentale nous a permis de déduire les valeurs des constantes de dissociation,  $Kd$ , de l'EDTA et de l'OrgBapta5N dans les conditions de nos expériences (cf. Figure 21) :  $Kd_{EDTA} = 0,002 \pm 0,04\mu M$  et  $Kd_{Org5N} = 53 \pm 7\mu M$ . Cet ajustement, dont les paramètres flottants étaient  $Kd_{EDTA}$ ,  $Kd_{Org5N}$  et  $[Ca^{2+}]_{init}$ , nous a également permis d'obtenir une estimation de la valeur du facteur  $f_N$  correspondant aux molécules d'OrgBapta5N libres. Ce dernier est très faible en com-

paraison avec le facteur  $f_B$ . De plus, on soulignera que le niveau de signal bas résulte, d'une part, de la contribution des molécules d'OrgBapta-5N libres mais également, de celle d'autres molécules "parasites", présentes dans la solution et relativement fluorescentes quelque soit la concentration calcique, comme je vais le montrer par la suite. Ainsi, le niveau de signal bas de la molécule d'OrgBapta-5N est noyé dans un fond et donc difficilement quantifiable. De ce fait, dans la suite des analyses théoriques, j'ai considéré  $f_N \simeq 0$ .

Le  $Kd_{EDTA}$  déduit des courbes est entaché d'une erreur importante, mais est cependant en bon accord avec celui attendu à pH=8 [56] [149]. Cette erreur ne peut malheureusement pas être minimisée du fait du grand nombre de paramètres laissés libres lors de l'approximation. Malgré cet écueil, on note qu'un facteur supérieur à 1000 sépare les valeurs des constantes de dissociation de l'EDTA et de l'OrgBapta5N. Ainsi cet écart permet de conclure que l'EDTA contrôle la teneur en calcium de nos solutions. De plus la concentration en OrgBapta5N est très petite devant celle de l'EDTA (typiquement  $10^{-9}$  à  $10^{-8}$ M, alors que celles en EDTA et en Calcium sont micromolaires) ce qui nous permet de faire l'hypothèse que la réaction de complexation du calcium par l'OrgBapta5N ne déplace pas l'équilibre réactionnel de l'EDTA.

Concernant l'OrgBapta5N, moins étudié que l'EDTA, on peut également trouver, dans la littérature, des valeurs expérimentales qui concordent avec nos résultats [160][45][62]. En effet, les ordres de grandeurs obtenus dans ces deux études correspondent à des valeurs de  $Kd$  comprises entre 20 et 90 micro-molaires.

Avant de clore ce paragraphe, on pourra également souligner l'écart entre la concentration calcique obtenue par approximation de la courbe de titrage  $[Ca^{2+}]_{init} = 206\mu M$  et celle théoriquement introduite dans nos échantillons  $[Ca^{2+}]_{init} = 180\mu M$  (préparée à base de calcium certifié anhydre). On peut justifier cette différence du fait de la présence de calcium résiduel dans les solutions utilisées et également du fait de la libération de calcium par les lamelles de microscope (seule verrerie utilisée pour l'expérience).

#### 5.2.4 Détermination de la viscosité de la solution

Outre la composition chimique de la solution, il est indispensable de contrôler sa viscosité, afin d'obtenir un temps de diffusion suffisant pour observer plusieurs cycles chimiques de complexation décomplexation de la molécule d'OrgBapta5N. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur les données préexistantes dans la littérature.

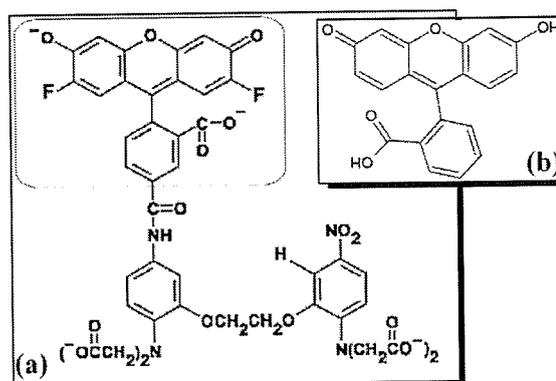


FIG. 22 – Comparaisons des molécules d’Oregon green BAPTA-5N (a) et de la fluorescéine (b). Sur la figure (a) la partie encadrée correspond à la molécule d’Oregon green.

En se référant aux travaux de G.C. Faas [45], nous avons pu évaluer la durée moyenne d’un cycle de complexation décomplexation,  $T_{cycle}$ , par la relation suivante :  $T_{cycle} \simeq \frac{1}{k_{off}} + \frac{1}{k_{on} \cdot [Ca^{2+}]_{libre}}$ . En considérant une concentration calcique libre de  $20 \mu M$ , et conformément à la référence précédente, en prenant  $k_{on} = 2,6 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$  et  $k_{off} = 7,5 \cdot 10^3 s^{-1}$ , on obtient  $T_{cycle} \simeq 320 \mu s$ . Ainsi, pour observer au moins deux cycles, il nous faut disposer d’un temps d’observation (temps de diffusion) au minimum de  $640 \mu s$ .

L’estimation du temps de diffusion de notre sonde requiert la connaissance des dimensions du volume focal et du rayon hydrodynamique de la sonde. Nous avons mesuré (cf. paragraphe 5.4.2) un volume focal de  $250 nm$  de rayon ( $w_r$ ) et avons pris  $1,2 nm$  comme rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) de la molécule d’OrgBapta5N (ces  $1,2 nm$  sont à comparer avec les  $0,8 nm$  trouvé dans la littérature [8], pour la molécule de fluorescéine, assez similaire à la molécule d’Oregon green 488, comme on peut le voir sur la Figure 22). En s’appuyant sur ces grandeurs, et en considérant une expérience à  $20^\circ C$ , on peut calculer l’évolution du coefficient de diffusion et du temps de diffusion en fonction de la viscosité ( $\eta$ ) de la solution, en utilisant les relations

3.5(a) et 3.6 que je rappelle ci-dessous :  $\tau_{D_r} = \frac{\omega_r^2}{4D}$  et  $D = \frac{k.T}{6\pi.\eta_\nu.R_h}$ .

$\eta$ ( $mPa.s$ )	1	5	10	20	30
$D.10^{-7}$ ( $cm^2.s^{-1}$ )	17,90	3,58	1,79	0,89	0,60
$\tau_D$ ( $\mu s$ )	87	437	874	1750	2620

**Tableau 3.1 : Évolution des paramètres de diffusion avec la viscosité**

J'ai regroupé les résultats correspondants dans le Tableau 3.1 ci-dessus. En s'appuyant sur ces données, nous avons opté pour une viscosité entre  $10mPa.s$ , afin de s'assurer que les paramètres  $k_{on}$  et  $k_{off}$  de la réaction chimique, encore inconnus dans nos conditions expérimentales, soient mesurables. Afin d'augmenter la viscosité de l'eau qui, à  $20^\circ C$ , est de  $1 mPa.s$ , il est donc nécessaire d'ajouter un constituant à la composition de nos échantillons. Ce dernier doit être biocompatible, c'est pourquoi nous avons initialement utilisé une solution à base de sucre, remplacée par une autre à base de glycérol (60% en masse dans les échantillons, soit une viscosité de  $10 mPa.s$ ). Nous avons testé l'influence du sucre sur la fluorescence de l'OrgBapta5N en réalisant deux solutions, comme présenté au paragraphe 5.2.1, à  $4,3.10^{-8}M$  d'OrgBapta5N, l'une préparée dans une solution contenant du sucre à hauteur de 30% en masse et la seconde contenant du glycérol à hauteur de 28% en masse leur conférant une viscosité d'environ  $2mPa.s$ . Nous avons mesuré une baisse du signal d'un facteur dix entre la solution préparée dans du glycérol et celle préparée dans du sucre. Le glycérol a donc été préféré pour la préparation des solutions utilisées pour l'expérience présentée dans cette partie.

### 5.3 Le montage optique

Le montage expérimental de FCS que j'ai utilisé au cours de mes travaux de thèse est constitué de trois éléments principaux : une ligne d'excitation monophotonique, une ligne d'excitation biphotonique et un microscope confocal inversé (cf. Figure 23).

#### 5.3.1 Les lignes d'excitation à un et deux photons

La ligne d'excitation monophotonique est constituée d'un laser à Argon dont on utilise la raie à 488nm, d'un filtre d'excitation (495AELP), d'un système lame  $\lambda/2$ -polariseur per-

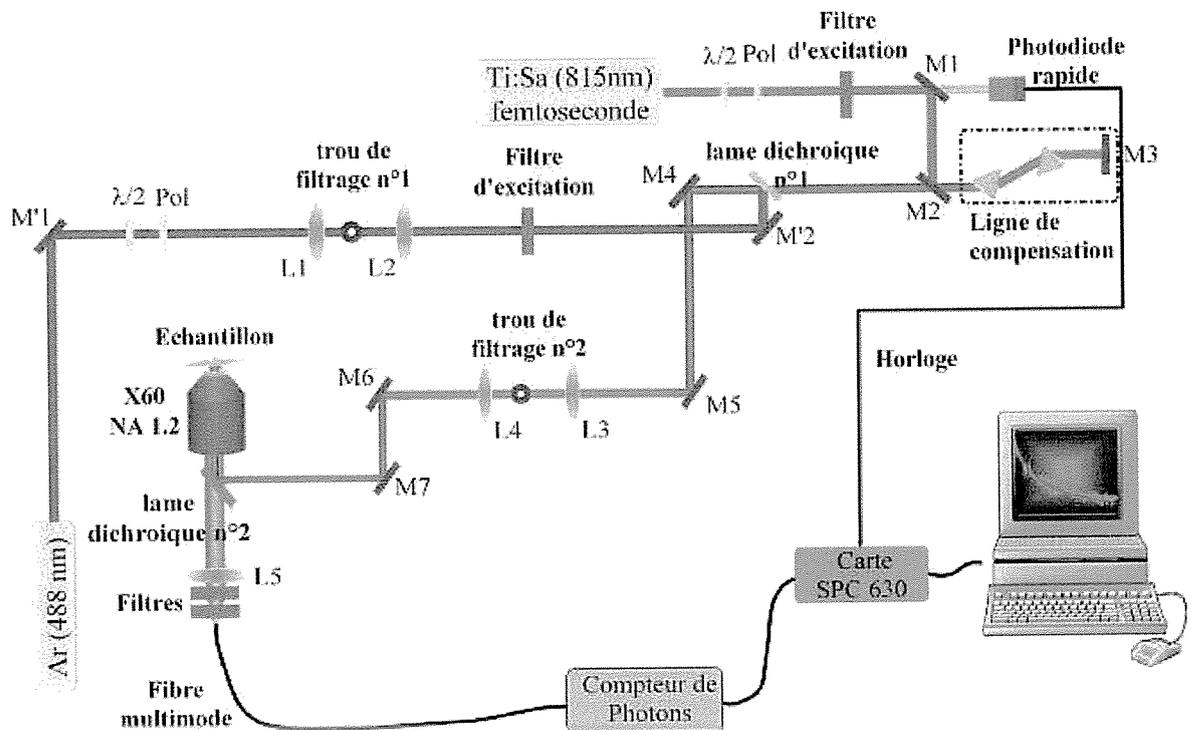


FIG. 23 – Montage expérimental.

Sur cette figure, les éléments représentés par "M" sont des miroirs, par "L" des lentilles, par " $\lambda/2$ " des lames de phase à  $\lambda/2$  et par "pol" des polariseurs.

mettant, non seulement de régler la puissance, mais aussi de choisir la polarisation du laser et d'un télescope ( $L1 = 100mm$ ,  $L2 = 150mm$ ,  $\phi_{filtrage1} = 50\mu M$ ) destiné à nettoyer et à ajuster la taille du faisceau et donc la dimension du spot d'excitation.

L'excitation biphotonique est réalisée grâce à un laser Titane Saphir femtoseconde (que nous avons réalisé) dont la géométrie a été calculée afin d'obtenir en sortie de cavité une impulsion d'une centaine de femtosecondes et une fréquence de répétition de  $54MHz$  (soit un intervalle temporel d'environ  $18ns$  entre deux impulsions successives), adaptée à la dynamique temporelle des phénomènes étudiés. La cavité a également été optimisée afin de minimiser les aberrations du faisceau en sortie de cavité (en particulier l'astigmatisme très néfaste en FCS). En sortie de laser, sont placés un filtre d'excitation (AELP720), un système  $\lambda/2$ -polariseur destiné à ajuster la puissance d'excitation et la polarisation, ainsi qu'une ligne de compensation de la dispersion composée de deux prismes identiques traversés, en aller-retour, par le faisceau avant recombinaison des deux lignes d'excitation.

La recombinaison des deux faisceaux s'effectue par une lame dichroïque transmettant au-delà de  $625nm$  (625DCLP) et réfléchissant la raie à  $488nm$  de l'Argon. Une fois superposés, les faisceaux sont mis en forme et filtrés par un second télescope ( $L3=200mm$ ,  $L4=100mm$ ,  $\phi_{filtrage2} = 40\mu m$ ) de grandissement deux. Ce dernier a pour rôle d'ajuster la taille du faisceau pour légèrement sous illuminer la pupille arrière de l'objectif et ainsi obtenir le meilleur compromis rapport signal sur bruit / géométrie du volume focal à un photon [64]<sup>27</sup>. En sortie de ce télescope, les faisceaux se propagent dans un microscope confocal inversé (Nikon TE2000) sur lequel est monté un objectif aplanétique, apochromatique,  $60\times$ , à immersion à eau, d'ouverture numérique 1,20 et muni d'une bague de correction de l'épaisseur de verre (lamelle de microscope) afin de minimiser l'aberration sphérique. La lame dichroïque (515 DRLP) placée à l'intérieur du microscope, utilisée afin de séparer l'excitation de l'émission est la même pour les deux lasers. Celle-ci réfléchit efficacement les longueurs d'onde inférieures à  $510nm$ , mais aussi le proche infrarouge ( $\lambda \geq 700nm$ ).

<sup>27</sup>Dans cette référence Hess et Webb préconisent de légèrement sous illuminer la pupille arrière de l'objectif de microscope afin de s'approcher au mieux d'une géométrie gaussienne-gaussienne du volume d'excitation à un photon.

### 5.3.2 La ligne de détection

La fluorescence issue de l'échantillon est collectée par le même objectif. Elle est transmise à travers la lame dichroïque, puis est focalisée par une lentille de tube de focale  $160\text{mm}$ . Le grandissement effectif du système est de 48. En sortie de microscope, le signal est filtré (Schott BG39, Omega 545AF75) de sorte à éliminer au mieux la fluorescence parasite, le bruit de diffusion et les divers signaux parasites éventuels (réflexions multiples de l'excitation par exemple). Puis, il est injecté dans une fibre multimode de diamètre de cœur  $50\mu\text{m}$ . Dans cette configuration, le trou de filtrage (cœur de la fibre) est un peu trop grand (de l'ordre de 5 fois la tache d'Airy [164]) pour considérer la collection comme véritablement confocale, mais l'alignement est grandement facilité et l'on obtient un long temps de diffusion. La fibre multimode est reliée à un compteur de photons uniques SPCM-AQR-FC (Perkin Elmer instruments). Ce dispositif utilise comme détecteur une photodiode à avalanche refroidie par un système de Peltier intégré, ce qui lui confère une efficacité quantique de détection supérieure à 70% à  $633\text{nm}$ . Sa réponse spectrale couvre une gamme de longueurs d'onde, allant de  $400\text{nm}$  à  $1060\text{nm}$ , sur une surface sensible de  $180\mu\text{m}$ . Le SPCM-AQR-FC atteint son niveau de saturation pour 15 millions de coups détectés par secondes ( $15\text{Mcps}\cdot\text{s}^{-1}$ ), possède une résolution temporelle de  $200\text{ps}$  et un bruit noir de  $50\text{cps}\cdot\text{s}^{-1}$ . Chaque détection de photon est suivie d'un temps mort de  $50\text{ns}$ . Ce compteur de photon est relié à une carte d'acquisition SPC-600 de chez Becker & Hickl GmbH. Elle permet d'acquérir l'histogramme des temps d'arrivées des photons de fluorescence détectés par le SPCM-AQR-FC, en prenant comme référence temporelle les impulsions femtosecondes de synchronisation (horloge). Ces dernières sont détectées par une photodiode rapide, mesurant le signal provenant d'une partie du faisceau prélevée sur le trajet de l'excitation biphotonique. Le logiciel associé calcule, à partir de ce signal, la durée de vie de fluorescence moyenne des spécimens en solution, et l'autocorrélation temporelle avec un pas de calcul défini par l'utilisateur. La carte SPC, utilisée dans la configuration de nos expériences, présente un temps mort de  $125\text{ns}$  et un taux de comptage maximum de  $10\text{Mcps}\cdot\text{s}^{-1}$ , ce qui fait d'elle l'appareil limitant le taux de comptage. Par contre, elle est à même de fournir une résolution temporelle de  $25\text{ps}$ .

## 5.4 Calibration du montage

Afin de définir correctement les paramètres expérimentaux en vigueur lors des expériences de détermination de la dynamique chimique de l'OrgBapta5N avec le calcium, il est indispensable de réaliser un certain nombre d'études préliminaires concernant le système optique, la sonde et la matrice dans laquelle va évoluer la sonde étudiée. Dans un premier temps, nous considérerons uniquement le cas de l'excitation monophotonique.

### 5.4.1 Calibration systématique du montage

La première étape indispensable avant d'entreprendre une expérience de FCS est la calibration du système. En réalisant l'acquisition du signal de diffusion d'une molécule fluorescente modèle (nous avons utilisé la Rhodamine B dont les spectres d'absorption et d'émission sont présentés sur la Figure 24), on peut corriger l'alignement et vérifier la stabilité du montage. Ce test constitue une référence pouvant permettre d'optimiser l'alignement délicat (alignement de la fibre de collection, contrôle des fluctuations de l'excitation...) et de déceler un potentiel problème sur le montage. Nous avons donc systématiquement effectué, avant

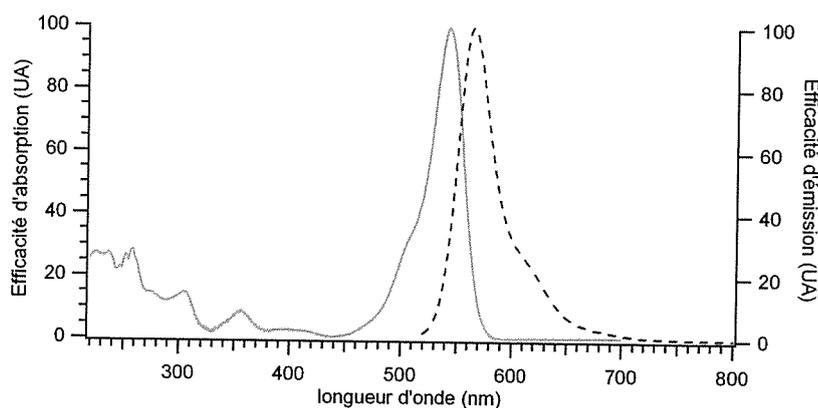


FIG. 24 – Spectres normalisés d'absorption et d'émission de la Rhodamine B.

chaque expérience, l'acquisition de la fonction d'autocorrélation de la Rhodamine B comme présenté à la figure 25. Ainsi, nous avons pu vérifier la stabilité du montage, en mesurant le nombre de coups moyen détecté pour une puissance et une concentration données, et en vérifiant la reproductibilité de la corrélation d'une expérience à une autre.

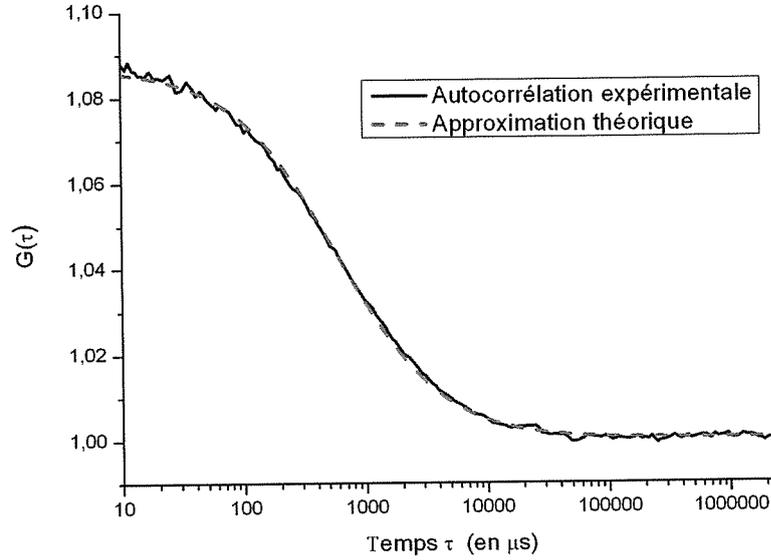


FIG. 25 – Courbe d'autocorrélation de la Rhodamine B ( $10^{-9}$  M) diffusant dans de l'éthylène glycol.

#### 5.4.2 Caractérisation du volume focal

Afin de limiter le nombre de paramètres variables lors de l'interprétation des courbes expérimentale d'autocorrélation par un modèle théorique, il est important de connaître la géométrie du volume focal et plus précisément les paramètres  $\omega_r$  et  $\omega_z$  le caractérisant. Pour ce faire, nous avons effectué une série d'expériences de FCS afin de déterminer ces données via les paramètres de diffusion de la molécule de rhodamine B. En effet, si on considère la diffusion brownienne des molécules de rhodamine B dont le rayon hydrodynamique peut être évalué, à  $20^\circ\text{C}$ , à  $0,42\text{nm}$  [73], dans un volume focal que l'on considérera comme Gaussien-Gaussien, on s'attend à ce que l'allure de la courbe d'autocorrélation du signal de fluorescence mesuré vérifie la relation 3.4(a), rappelée ci-dessous :

$$G_D(\tau) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{Dr}}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + r^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{Dr}}}}$$

On rappelle que  $\gamma$  est le contraste volumique et que nous lui attribuerons la valeur 1 (cas d'un volume Gaussien-Gaussien pour une excitation monophotonique), que  $\langle N \rangle$  correspond

au nombre moyen de molécules fluorescentes dans le volume focal, que  $r$  est égal au rapport  $\frac{\omega_r}{\omega_z}$  des dimensions latérale et axiale des rayons du volume focal, et que  $\tau_{D_r}$  représente le temps de diffusion d'une molécule à travers le volume focal. Pour une excitation à un photon, on peut relier  $\tau_{D_r}$  au coefficient de diffusion  $D$  par la relation 3.5(a).

Si on considère un mouvement brownien, ce coefficient de diffusion  $D$  dépend de la température  $T$  (en  $K$ ), de la viscosité du milieu de diffusion  $\eta_\nu$  (exprimé en  $Pa.s$ ), et du rayon hydrodynamique  $R_h$  des particules considérées. Il est défini par la formule de Stokes-Einstein (3.6).

Pour obtenir une valeur statistique sur plusieurs expériences, nous avons travaillé avec une série de solutions de viscosité variable préparées dans des milieux l'indice de réfraction proche de celui des solutions d'OrgBapta5N et ce afin de conserver un volume focal comparable à celui des expériences faite sur cette molécule. La composition de ces solutions est la suivante :  $[RhB]=2.10^{-9}M$ , mélange eau-glycérol à hauteur de 56, 60 et 65% en masse, correspondant respectivement à une viscosité de 8, 10,8 et 15,2mPa.s et à des indices de réfraction de 1,407, 1,413, 1,419. Nous avons fait l'acquisition des courbes de diffusion sur une goutte de cette solution déposée sur une lamelle de BK7 avec une excitation à 488nm et une puissance sur l'échantillon de  $5\mu W$ . En déterminant  $\tau_{D_r}$ , à partir des courbes expérimentales d'autocorrélation du signal de fluorescence, on peut donc estimer le rayon latéral  $\omega_r$  du faisceau, en traçant l'évolution de ce temps de diffusion en fonction de la viscosité,  $\eta_\nu$ , des solutions (cf. Figure 26) :

$$\tau_{D_r} = \frac{6\pi \cdot R_h \cdot \omega_r^2}{4k \cdot T} \eta_\nu \quad (3.21)$$

La pente de la droite obtenue donne accès à la valeur de  $\omega_r$ .

Les résultats obtenus sont présentés sur la courbe 26. Nous avons donc pu en déduire une valeur approchée du rayon  $\omega_r$  du volume focal, dans le mélange eau glycérol :

$$\omega_r(gly)=252 \pm 20nm.$$

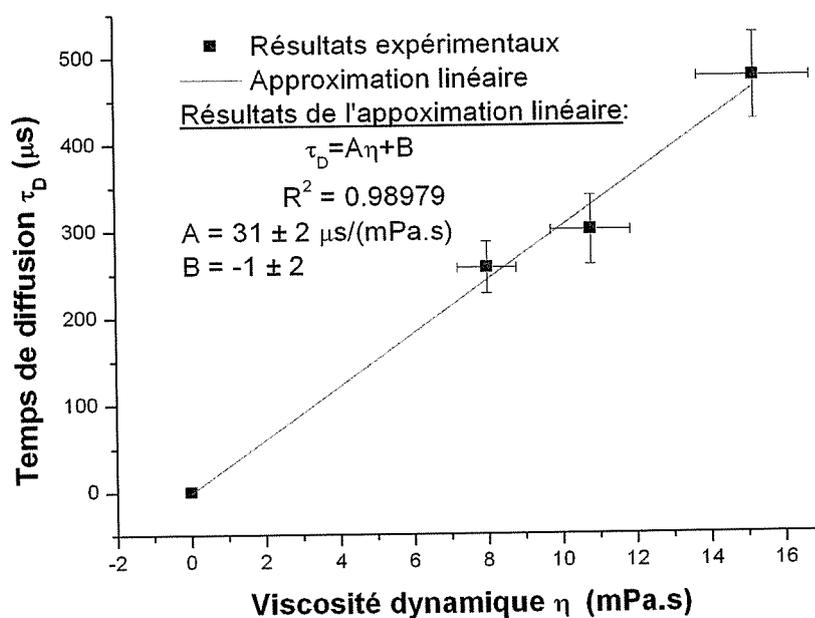


FIG. 26 – Étude FCS de l'évolution du temps de diffusion de molécule de Rhodamine B en fonction de la viscosité des solutions considérées.

## 6 Résultats expérimentaux

### 6.1 Optimisation des paramètres expérimentaux.

Afin de pouvoir étudier un équilibre chimique en solution, il est indispensable de s'assurer que les autres composants présents dans l'échantillon n'interagissent pas de manière importante avec les acteurs auxquels on s'intéresse. Dans ce paragraphe, je présenterai les choix que nous avons effectués afin de limiter leur impact sur nos résultats.

#### 6.1.1 La force ionique

La force ionique des solutions expérimentales est un paramètre qui s'est avéré critique. On le définit comme suit :

$$F_I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (3.22)$$

Où l'on somme sur les  $i$  ions présents dans la solution le produit de la concentration molaire  $C_i$  par le carré de la charge  $z_i$  de l'espèce ionique  $i$ .

Ce paramètre contrôle l'écrantage ionique dans la solution considérée. Nous avons vérifié qu'avec une force ionique faible, inférieure à  $1mM$ , les niveaux haut et bas de fluorescence, obtenus pour des sondes complexées et libres respectivement étaient très voisins. Une auto-corrélation équivalente à une diffusion pure était observée quelle que soit la concentration d'EDTA, toute signature d'un clignotement chimique étant absente (cf. Figure 27).

Ce résultat traduit l'influence de la force ionique sur l'efficacité de fluorescence et en particulier sur les phénomènes bloquant la fluorescence ("quenching"). En effet, on constate bien que pour une force ionique trop faible, l'émission de fluorescence par l'OrgBapta5N est comparable lorsque la concentration calcique est faible et lorsque celle-ci est importante. L'hypothèse la plus probable pour justifier ce phénomène est la suivante : lorsque l'écrantage diminue, d'une part, la stabilité de l'espèce de transfert de charge est diminuée, ce qui rend le transfert moins favorable et, d'autre part, la molécule peut changer de conformation pour en prendre une moins favorable au transfert de charges. On observe alors que le blocage de la fluorescence de l'Oregon Green grâce au PET ne fonctionne plus, même en l'absence d'ion calcium.

Sachant que la molécule d'OrgBapta5N a été développée pour travailler en milieu biolo-

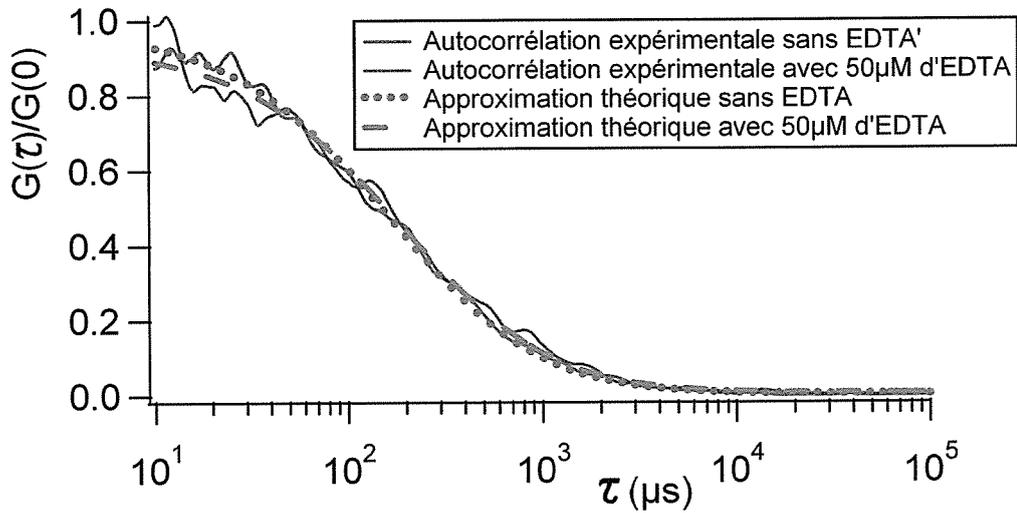


FIG. 27 – Comparaison des courbes d'autocorrélation normalisées pour des échantillons à faible force ionique. On distingue sur ce graphique deux courbes expérimentales et les approximations théoriques correspondantes, obtenues dans les conditions suivantes :  $[Org] = 2.10^{-9}M$ , pour une faible concentration calcique ( $50\mu M$  d'EDTA pour  $60\mu M$  de  $CaCl_2$ , courbes bleues) et pour une forte concentration calcique ( $60\mu M$  de  $CaCl_2$ , sans EDTA, courbes rouges).

gique, nous avons adapté la composition de nos échantillons de sorte que ceux-ci disposent d'une force ionique équivalente à la force ionique physiologique, de l'ordre de 100 et  $150mM$  [62][45][37]. Ainsi, nous avons introduit dans la composition de nos échantillons, en quantité suffisante pour obtenir une force ionique correcte, un composant biocompatible n'interférant pas avec la réaction étudiée, à même de réguler ce paramètre : le KCl. Pour calculer la force ionique de nos solutions, nous ne considérerons que l'influence du KCl puisque les autres constituants, présents à des concentrations beaucoup plus faibles, n'influencent pratiquement pas le résultat obtenu. En effectuant cette simplification, la force ionique de nos échantillons s'écrit simplement :  $F_I = \frac{1}{2}([K^+] + [Cl^-])$

Nous avons choisi de travailler avec une concentration de KCl de  $144mM$ , obtenant ainsi une force ionique équivalente à la force ionique physiologique.

En augmentant la force ionique de nos échantillons, de composition identique par ailleurs, on observe une modification des courbes de FCS en fonction de la concentration d'EDTA qui traduit la réaction de clignotement entre l'état complexé et l'état non complexé de la molécule d'OrgBapta5N (cf. eq. 3.8 et 3.12(a)).

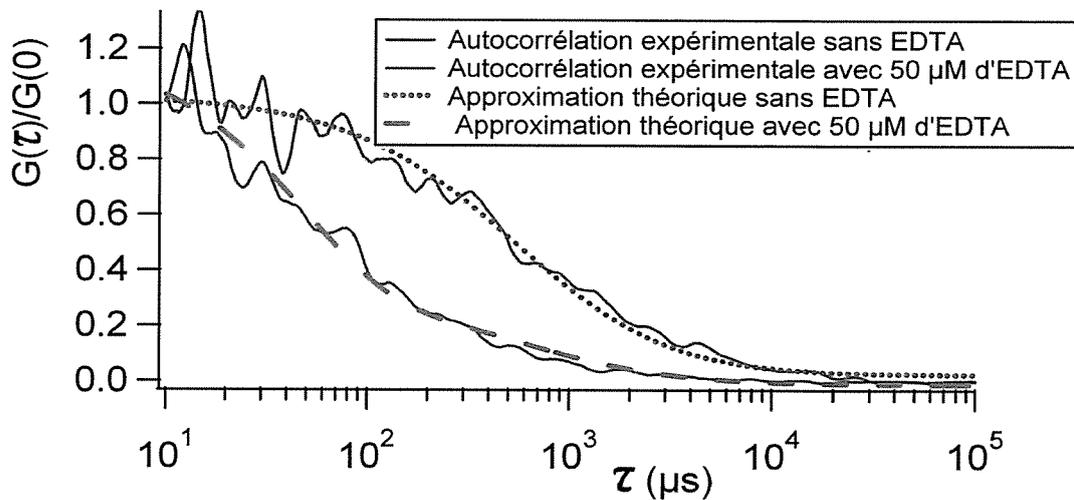


FIG. 28 – Comparaison des courbes d'autocorrélation normalisées pour des échantillons à force ionique physiologique. On distingue sur ce graphique deux courbes expérimentales et l'approximation théorique correspondante, obtenues dans les conditions suivantes :  $[\text{Org}] = 2.10^{-9}\text{M}$ , pour une faible concentration calcique ( $50\ \mu\text{M}$  d'EDTA pour  $60\ \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ , courbes bleues) et pour une forte concentration calcique ( $60\ \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ , sans EDTA, courbes rouges).

### 6.1.2 Amélioration du rapport signal sur bruit : influence de la concentration d'Oregon green BAPTA 5N

L'OrgBapta5N doit, dans nos échantillons, être présent en très faible concentration, afin de nous placer dans les conditions d'une étude à l'échelle de la molécule unique. Cependant, il est indispensable de tenir compte du niveau de bruit afin de conserver un signal utile supérieur à ce dernier. Par conséquent, nous avons effectué une série d'expériences visant à déterminer la concentration qui, compte tenu de l'efficacité de détection de notre système et du bruit de fond, donnera un rapport signal sur bruit satisfaisant sur toute la gamme de concentration effective en calcium sondée. Pour la recherche d'une concentration bien adaptée, nous avons travaillé avec une solution saturée en calcium ( $[\text{EDTA}] = 0$ ). Cette situation est favorable du point de vue du signal utile. A l'époque, le rayons du volume focal était d'environ  $450\text{nm}$ .

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. eq. 3.7(c)), le paramètre  $G_D(0)$ , fournit un moyen d'évaluer le nombre de molécules moyen dans le volume focal si l'on connaît le bruit. Il varie comme  $\frac{1}{S_t}$ , où  $S_t = S_u + \langle B \rangle$  est le signal total. Le signal utile,  $S_u$ , est re-

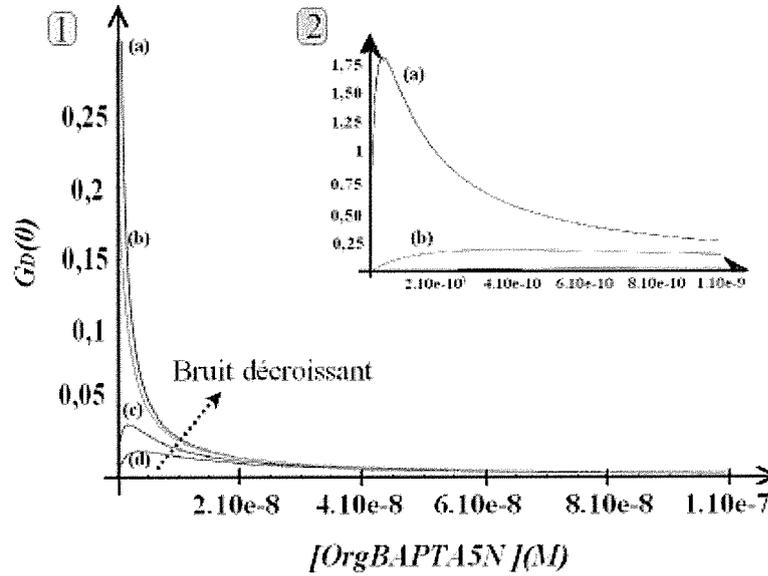


FIG. 29 – Simulation des variations de  $G_D(0)$  en fonction de la concentration d'OrgBAPTA5N, pour différentes contributions du bruit de fond. -1- (a)  $\langle B \rangle = 100 \text{cps/s}$ , (b)  $\langle B \rangle = 1000 \text{cps/s}$ , (c)  $\langle B \rangle = 5000 \text{cps/s}$ , (d)  $\langle B \rangle = 10000 \text{cps/s}$ . Nous avons considéré un volume focal de rayons  $w_r = 0,8 \mu\text{m}$  et  $w_z = 10w_r$  et un nombre de coups émis par seconde par molécule de 730. -2- Agrandissement des courbes (a) et (b).

lié au nombre de molécules présentes dans le volume focal,  $\langle N \rangle$ , par la relation suivante :  $S_u = s_u \langle N \rangle = s_u \aleph_a V_{eff} [Org]$ , avec  $s_u$  le signal émis par une molécule,  $V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} w_0^2 z_0$  le volume focal,  $\aleph_a$  le nombre d'Avogadro et  $[Org]$  la concentration en OrgBapta5N. Nous avons effectué des simulations (cf. Figure 29) afin de caractériser l'impact du paramètre  $\langle B \rangle$ , bruit de fond moyen, sur le profil de la courbe d'évolution du  $G_D(0)$ , en fonction de la concentration. Pour un bruit de fond non nul, l'ordonnée à l'origine de la courbe de corrélation,  $G_D(0)$ , présente un maximum fonction de la concentration en OrgBapta5N, dont l'intensité décroît rapidement avec le niveau de bruit. Plus le bruit est important, plus il est nécessaire d'accroître la concentration de molécules pour obtenir un rapport signal sur bruit convenable, ce qui dégrade fortement le contraste de la courbe d'autocorrélation. Il est donc indispensable de réduire au mieux les sources de bruit pour travailler dans des conditions satisfaisantes en FCS.

Sur une précédente expérience, afin d'évaluer la concentration à laquelle nous devions

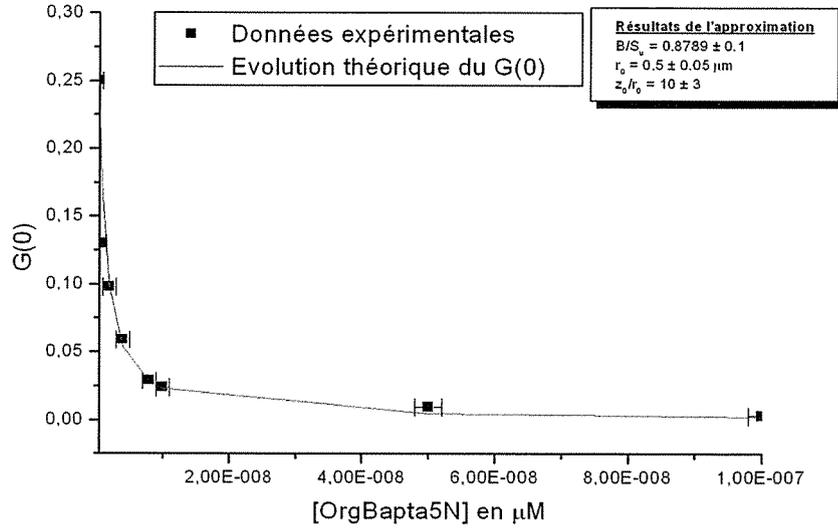


FIG. 30 – Évolution du  $G(0)$  en fonction de la concentration d'OrgBapta5N.

travailler, nous avons fait l'acquisition d'une série de courbes d'autocorrélation en modifiant uniquement la concentration en OrgBapta5N, le reste de la composition des échantillons étant inchangé. Les données expérimentales ont été acquises avec une puissance a priori raisonnable pour les expériences, c'est-à-dire suffisamment proche de la saturation pour obtenir un niveau de signal relativement important et pour laquelle le photoblanchiment reste faible. Nous avons déterminé, à partir des données expérimentales, le rapport reliant le signal émis par une seule molécule,  $s_u$ , et le bruit de fond moyen,  $\langle B \rangle$ .

Nous avons comparé les données expérimentales (cf. Figure 30) acquises avec une puissance excitatrice d'environ  $16 \mu W$  sur l'échantillon, à la longueur d'onde de  $488 nm$ , aux valeurs données par la fonction suivante :

$$G_D(0) = \frac{\aleph_a V_{eff}[Org]}{\left(\aleph_a V_{eff}[Org] + \frac{B}{s_u}\right)^2} = \frac{\langle N \rangle}{\left(\langle N \rangle + \frac{B}{s_u}\right)^2} \quad (3.23)$$

La courbe correspondante est décrite par la courbe en trait plein de la Figure 30. La comparaison expérience/théorie conduit à une valeur du rapport entre bruit et signal utile moyen émis par une seule molécule :  $\frac{B}{s_u} = 0,87 \pm 0,1$ . Dans cette configuration, le bruit de fond

est approximativement du même ordre de grandeur que le signal émis par une seule molécule. Ainsi, si on diminue trop le nombre moyen de molécules dans le volume focal, le rapport signal sur bruit chute. On ne peut donc pas diminuer la concentration en molécule jusqu'à atteindre en moyenne moins d'une molécule dans le volume focal. En se fondant sur cette comparaison, la concentration optimale d'OrgBapta5N était à l'époque voisine de  $4 \cdot 10^{-9} M$ , valeur qui conduisait à un bon compromis entre le nombre de molécule et le rapport signal sur bruit. En effet, cette concentration correspond, en utilisant des dimensions du volume focal compatibles avec les valeurs mesurées sur le montage de l'époque ( $w_0 \simeq 0,5 \mu m$  et  $z_0 \simeq 10w_0$ ), à un nombre moyen de 17 molécules dans le volume focal et à un rapport signal sur bruit :  $R_{S/B} = \frac{S_u}{S_u+B}$ , égal à 95% pour le niveau haut.

Pour l'expérience présentée dans la suite de cette partie, le volume focal étant plus petit et la collection meilleure, nous avons fait le choix de travailler avec une concentration en OrgBapta5N de  $2 \cdot 10^{-8} M$ .

### 6.1.3 Étude de la saturation

Enfin, avant de passer aux expériences d'étude de la sonde à proprement dite, nous avons étudié le signal de fluorescence en fonction de la puissance excitatrice. Cette étude permet d'évaluer à la fois la saturation de l'émission de fluorescence et le photoblanchiment mais également de déterminer les conditions expérimentales favorables à un bon rapport signal sur bruit.

Nous avons réalisé l'expérience sur des échantillons d'OrgBapta5N saturés en calcium ( $[EDTA] = 0 \mu M$ ), de sorte à mesurer les propriétés de l'état complexé de la molécule d'OrgBapta5N. Leur composition est celle des échantillons présentés au paragraphe 5.2.1 contenant du glycérol (28% en masse) afin de ralentir la diffusion. L'approximation théorique des données expérimentales ainsi obtenues nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres tels que la fonction de collection, le profil d'émission et le profil d'excitation.

Nous nous sommes appuyés sur une étude de Enderlein [55] pour créer notre modèle. Ainsi, nous avons défini le volume de détection (cf. Figure 31), par la fonction  $CEF(\rho, z)$ ,  $\rho$  et  $z$  correspondant aux coordonnées latérales et axiales dans le plan focal de l'objectif,

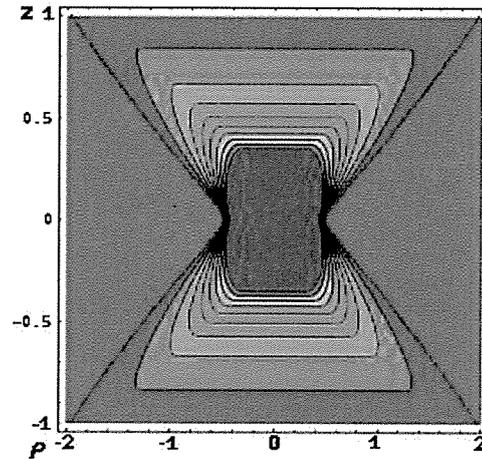


FIG. 31 – Modélisation du volume de détection pour un trou de filtrage de diamètre  $50\mu\text{m}$ .  $\rho$  et  $z$ , coordonnées latérale et axiale dans le plan focal de l'objectif, sont exprimées en microns.

décrite comme suit :

$$CEF(\rho, z) = \begin{cases} 0 & , \rho \geq R + a \\ \max(a, \omega)^2 \frac{(\theta_1 a^2 + \theta_2 R^2 - \Delta)}{\pi a^2 R^2} & , |R - a| < \rho < R + a \\ \frac{\max(a, \omega)^2}{\max(a, R)^2} & , \rho \leq |R - a| \end{cases} \quad (3.24)$$

Avec

$$\begin{aligned} \rho &= \sqrt{x^2 + y^2} \\ R(z) &= \omega \sqrt{1 + \left(\frac{z \lambda_{em}}{\pi \omega^2}\right)^2} \\ \omega &= \frac{\lambda_{em}}{\pi \tan \Theta} \\ \theta_1 &= \arccos \left[ \frac{a^2 + \rho^2 - R^2}{2a\rho} \right] \\ \theta_2 &= \arccos \left[ \frac{R^2 + \rho^2 - a^2}{2R\rho} \right] \\ \Delta &= \frac{\sqrt{(a+\rho+R)(-a+\rho+R)(a-\rho+R)(a+\rho-R)}}{2} \end{aligned}$$

où  $\lambda_{em}$  est la longueur d'onde du maximum d'émission du fluorophore étudié (ici  $\lambda_{em} = 521\text{nm}$ ),  $\Theta$  est l'angle maximum de collection défini par l'ouverture numérique,  $NA = 1,20$ , de l'objectif et l'indice de réfraction du milieu d'immersion,  $n = 1,336$ , tel que  $\sin\Theta = \frac{NA}{n}$ , et  $a = \frac{25}{60}$  est le rayon du trou de filtrage de la détection confocale divisé par le grandissement de l'objectif de microscope, ce qui correspond au rayon du trou de filtrage dans le plan objet.

Pour reproduire de façon assez réaliste les résultats expérimentaux, nous avons eu recours

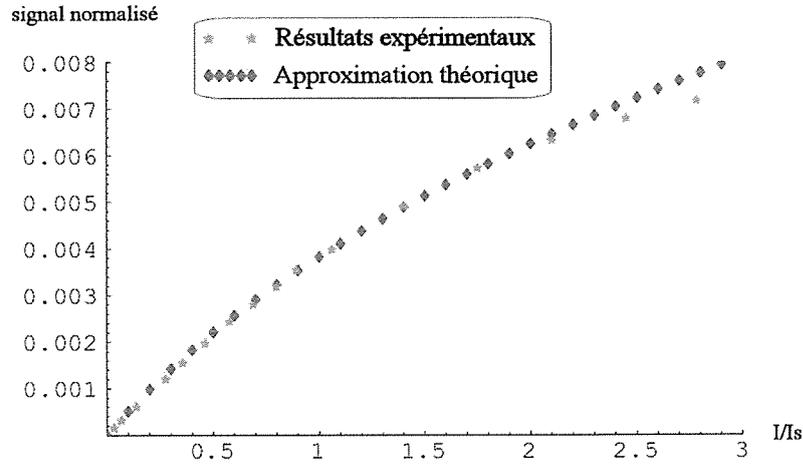


FIG. 32 – Résultat de l'approximation de la courbe de saturation expérimentale par la relation 3.25.

à un modèle de volume focal non gaussien-gaussien représenté sur la Figure 31.

Nous avons ensuite fait l'approximation d'une émission homogène pour un plan  $z$  donné, et avons modélisé le signal émis par la relation suivante :

$$S_{\text{détecté}}^{\text{init}}\left(\frac{I}{I_s}\right) = \int_{-\infty}^{+\infty} dz \left[ \int_0^{|R(z)-a|} CEF(\rho, z) EID\left(\frac{I}{I_s}, z\right) \rho d\rho + \int_{|R(z)-a|}^{R(z)+a} CEF(\rho, z) EID\left(\frac{I}{I_s}, z\right) \rho d\rho \right] \quad (3.25)$$

Où  $EID\left(\frac{I}{I_s}, z\right) = \frac{\frac{I}{I_s} \left(\frac{\omega}{R(z)}\right)^2}{1 + \frac{I}{I_s} \left(\frac{\omega}{R(z)}\right)^2}$  représente le signal émis par les molécules, dans le plan  $z$ , sous une intensité excitatrice  $I$ . Ce modèle correspond au cas de molécules dont la polarisation tourne plus rapidement que les processus d'absorption et d'émission de la molécule étudiée. Dans cette approximation, on considère une polarisation moyenne sur tout l'espace :

$\int_{\text{espace}} \cos^2 \theta = \frac{1}{3}$ , où  $\theta$  correspond à l'angle entre la polarisation de la molécule et la polarisation de l'excitation.

On remarque, en se référant à la Figure 32, que cette modélisation du signal détecté parvient à reproduire très correctement les données expérimentales pour un rapport  $\frac{I}{I_s}$  inférieur à 2. Au-delà, le signal détecté devient légèrement inférieur au signal prédit par notre modèle, ce qui pourrait s'expliquer par la contribution du photoblanchiment.

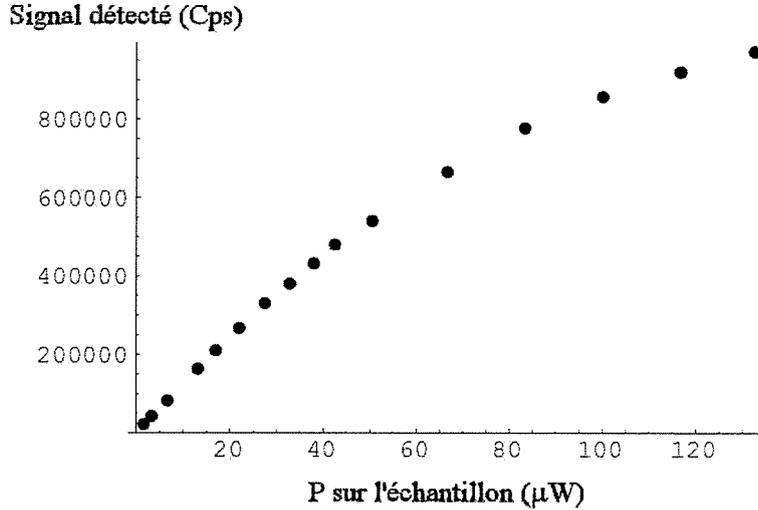


FIG. 33 – Courbe de saturation expérimentale en fonction de la puissance excitatrice sur l'échantillon.

Nous avons ensuite effectué une seconde simulation pour laquelle nous nous sommes intéressés au cas de molécules dont la rotation serait plus lente que les processus d'absorption-émission en présence. Ce modèle est décrit en annexe (cf. Annexe 2 : Modèle de saturation). On s'attend à un temps caractéristique de rotation  $\tau_{rot} = \frac{\eta V}{kT}$ , où  $V$  est le volume hydrodynamique de la molécule, de l'ordre de la nanoseconde, légèrement inférieur à la durée de vie du niveau excité d'environ  $4ns$ . La situation réelle est donc intermédiaire entre le régime de rotation rapide et le régime statique, mais probablement plus proche du cas de la rotation rapide.

Les deux modèles permettent d'approcher correctement les résultats expérimentaux.

Les données expérimentales sont présentées à la figure 33 ci-dessus, en mesurant l'intensité de fluorescence pour une puissance excitatrice donnée sur l'échantillon.

L'analyse théorique permet de déterminer la puissance, sur l'échantillon, correspondant à  $\frac{I}{I_s} = 1$ , dans le plan focal. La puissance de saturation déduite de l'approximation d'une rotation rapide des dipôles moléculaires est de  $P_s = 48\mu W$  sur l'échantillon. Celle déduite de l'approximation d'une rotation lente des dipôles conduit au résultat suivant :  $P_s = 30\mu W$ . Lors de nos expériences, nous avons travaillé à une puissance de  $25\mu W$  sur l'échantillon afin de nous placer dans une configuration favorable pour l'obtention d'un bon rapport signal sur

bruit et de nous protéger d'un photoblanchiment prématuré.

#### 6.1.4 Etude spectrale

Afin de vérifier la cohérence des résultats obtenus lors du titrage de l'OrgBapta5N par l'EDTA en terme de rapport entre l'intensité de fluorescence du niveau haut (OrgBapta5N complexé) et du niveau bas (OrgBapta5N libre), et afin d'étudier l'impact de l'autofluorescence de la solution sans OrgBapta5N sur les signaux mesurés, nous avons effectué une étude spectrale. Celle-ci vise à mesurer les spectres d'émission de fluorescence de trois solutions l'une correspondant au tampon, l'autre au niveau bas ( $[EDTA] = 300\mu M$ ) et la dernière au niveau haut ( $[EDTA] = 0\mu M$ ). Cette expérience a été réalisée sur les mêmes échantillons que ceux utilisés lors des expériences présentées dans la partie 6 de ce chapitre et dont la composition est décrite au paragraphe 5.2.

Le dispositif expérimental que nous avons utilisé afin de réaliser ces mesures est un montage destiné à l'étude du spectre d'émission Raman de nanotubes uniques. C'est un montage confocal constitué d'un double monochromateur doté d'un système de filtrage spatial effectué par une fente de largeur  $25\mu M$  et sur lequel l'excitation des échantillons et la détection des signaux mesurés (émission de fluorescence, diffusion Raman) sont réalisés par un objectif de microscope  $60\times$ , d'ouverture numérique 0,6 et possédant une bague de correction des épaisseurs de verre permettant de corriger correctement l'épaisseur des cuves que nous avons utilisées pour la mesure du spectre d'émission de nos échantillons.

Nous avons dans un premier temps fait l'acquisition des spectres des trois échantillons avec un temps d'exposition de 6 secondes par nanomètre, une excitation à 496,5nm et une puissance de  $110nW$ . La longueur d'onde utilisée correspond à celle pour laquelle le montage expérimental a été optimisé et reste très proche de celle utilisée aux cours des expériences de FCS. Les spectres ainsi obtenus sont regroupés sur la figure 34. On constate que la solution tampon utilisée pour réaliser nos échantillons présente un niveau de fluorescence résiduel non négligeable sur la plage spectrale 510-580 nm, transmise par notre filtre de détection, avec un maximum autour de 545nm.

Afin d'extraire de ces données, les spectres propres à la molécule d'OrgBapta5N complexée et à celle d'OrgBapta5N libre, nous avons, d'une part, fait l'acquisition du signal parasite provenant de la cuve (vide) utilisée lors de l'acquisition des autres spectres et, d'autre part,

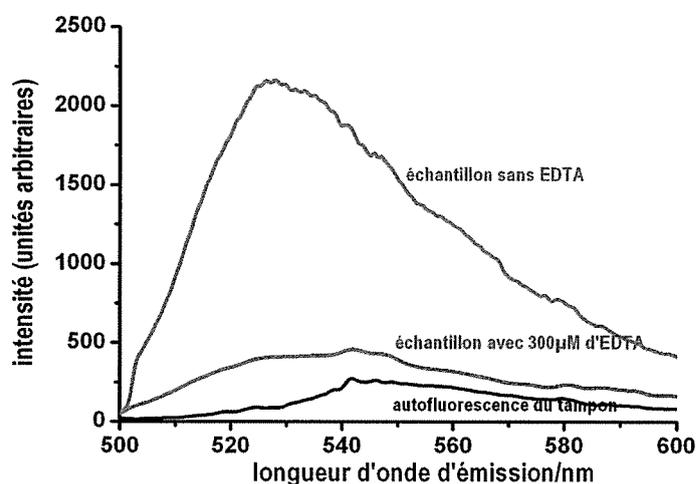


FIG. 34 – Spectres d'émission de fluorescence mesurés à  $496,5\text{nm}$ . Sont présentés, en bleu le spectre d'émission d'un échantillon d'OrgBapta5N de concentration  $2.10^{-8}\text{M}$  présentant une forte concentration en calcium (environ  $205\mu\text{M}$  de calcium, sans EDTA); en rouge celui d'un échantillon faiblement concentré en calcium (environ  $205\mu\text{M}$  de calcium, avec  $300\mu\text{M}$  d'EDTA) et en noir celui du tampon utilisée pour la fabrication des deux autres échantillons, en l'absence d'OrgBapta5N. On notera l'existence sur ces courbes de quelques rebonds résiduels liés aux signaux Raman parasites.

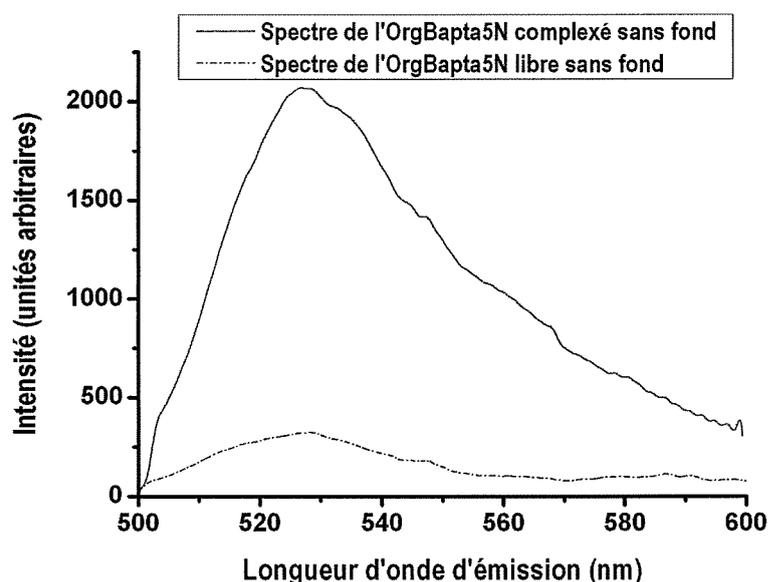


FIG. 35 – Spectres d'émission de l'OrgBapta5N complexé et libre.

soustrait ce dernier et le spectre du tampon aux spectres d'émission des solutions d'OrgBapta5N complexé et libre. Le spectre de la cuve vide ne présente pas de fluorescence mais uniquement des raies Raman imputables à la cuve elle-même et aux éléments optiques du montage (miroirs). Ces résultats sont présentés sur la figure 35. On constate que le spectre d'émission de l'OrgBapta5N complexé est plus large que celui de la molécule libre. Cet élargissement ainsi que les décalages en découplant pourraient traduire d'éventuelles reconformations des molécules lorsque complexées.

La mesure des spectres de l'OrgBapta5N dans la solution tampon expérimentale permet de remonter au rapport attendu entre les signaux respectifs des niveaux haut et bas de fluorescence en fonction de la longueur d'onde de coupure du filtre de détection. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 36. Sachant que la coupure du filtre que nous avons utilisé s'effectue entre 570 et 580nm, on constate, en se rapportant à la figure (b), que le rapport entre niveaux de signal haut et bas est très fortement diminué par la présence du fond d'auto-fluorescence parasite. On s'attend, dans notre cas, à un rapport d'environ 4,2 à comparer au facteur 7 attendu pour un tampon sans autofluorescence. Dans notre cas, l'utilisation d'un filtre étroit serait donc plus favorable. Par ailleurs, on notera que le rapport de 4,6 mesuré lors de l'expérience de titrage effectuée à la longueur d'onde voisine de 488nm est bien cohérent

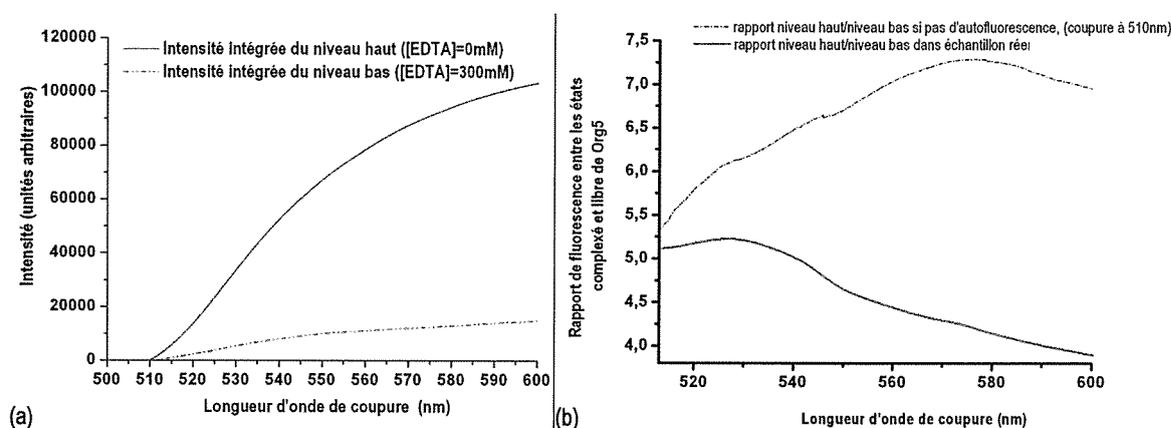


FIG. 36 – Comparaison des niveaux d'intensité totale en fonction de la largeur spectrale de la bande d'intégration. Les courbes présentées sur le graphique (a) présentent l'évolution des niveaux haut et bas de signal émis par la molécule, intégrés en fonction de la largeur du filtre de détection celui-ci ouvrant à 510nm. Le graphique (b) présente l'évolution du rapport entre ces deux niveaux en fonction de la fréquence de coupure du filtre de détection pour un échantillon sans autofluorescence et avec le même niveau d'autofluorescence que dans nos échantillons.

avec les valeurs prédites par l'étude spectroscopique.

## 6.2 Mesure des paramètres chimiques

Une fois le montage caractérisé et la composition chimique des échantillons déterminés, viennent les expériences de mesures des paramètres chimiques de la sonde dans son milieu d'étude. Le principe de l'expérience repose sur l'acquisition d'une série de courbes de corrélation, chacune d'entre elles correspondant à un échantillon de concentration calcique donnée. La plage des concentrations étudiée a été choisie de sorte à couvrir toute la gamme d'utilisation de la sonde. Plus précisément, pour une concentration calcique initiale théoriquement égale à  $180\mu M$ , nous avons réalisé des échantillons présentant des concentrations d'EDTA comprises entre 0 et  $300\mu M$ .

La première étape de l'expérience a consisté à faire l'acquisition (environ 3500 000 photons par acquisition) des différentes courbes d'autocorrélations, dans les mêmes conditions expérimentales, à savoir à une température  $T = 25^\circ C$ , sous une excitation à 488nm et une puissance excitatrice sur l'échantillon de  $P = 25 \pm 1 \mu W$ . La composition des solutions utilisées, telle que nous l'avons décrite au paragraphe 5.2 ( $KCl$  à  $144mM$ ,  $TrisHCl$  à  $3mM$ ,

*OrgBapta5N* à  $2.10^{-8}M$ , glycérol à hauteur de 60% en masse), confère à nos échantillons une viscosité dynamique  $\eta = 10.10^{-3} \pm 0,1.10^{-3} Pa.s$ , et un indice de réfraction  $n = 1,429 \pm 0,006$ . Les acquisitions ont été effectuées sur le montage décrit précédemment (cf. Figure 23) avec un objectif à immersion à eau ( $n = 1,337 \pm 0,001$ ) de grandissement  $60\times$  et d'ouverture numérique 1,2.

Dans un premier temps, le traitement de ces données consiste à analyser la courbe d'auto-corrélation à  $0\mu M$  d'EDTA, en supposant que les molécules d'*OrgBapta5N* sont majoritairement complexées, du fait de la forte concentration en calcium, mais en laissant tout de même varier les paramètres chimiques. Dans les conditions de notre expérience, durant laquelle nous avons travaillé avec un objectif de grande ouverture numérique, avec un trou de filtrage de  $50\mu m$ , et une puissance excitatrice très proche de la saturation, l'approximation des données expérimentales par une diffusion 3D gaussienne-gaussienne (définie par les équations (3.3) et (3.4(a))), fournit un résultat satisfaisant sur l'intervalle temporel  $10 - 2.10^6\mu s$ , en deçà, la considération de phénomènes plus rapides tels que la conversion singulet-triplet, des changements rapides de conformation, ou la rotation des molécules sont à prendre en compte. Ainsi, afin de reproduire correctement cette courbe correspondant à la diffusion 3D de l'*OrgBapta5N* en milieu fortement concentré en calcium, nous utiliserons l'expression suivante, en se restreignant à l'intervalle  $10 - 2.10^6\mu s$  :

$$G(\tau) = A + G_D^0(0) \cdot (1 + p \exp(-\frac{\tau}{\tau_c})) \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_{Dr}})} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + r^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{Dr}}}} \quad (3.26)$$

Elle dépend des paramètres tels que : l'ordonnée à l'origine,  $G_D^0(0)$ , le rapport entre les dimensions latérales et axiales du volume focal,  $r$ , le temps de diffusion,  $\tau_{Dr}$ , le temps chimique  $\tau_c$ , et le paramètre  $p$  caractérisant la réaction chimique. Le paramètre  $A$  théoriquement égal à 1 est ajouté afin de tenir compte d'un éventuel offset sur la courbe d'autocorrélation.

Les résultats de cette approximation, présentés à la Figure 37, nous ont permis de remonter aux valeurs des différentes grandeurs énoncées ci-dessus :

$$G_D^0(0) = 0,0478 \pm 0,0007$$

$$\tau_{Dr} = 756 \pm 23 \mu s$$

$$r = 0,1$$

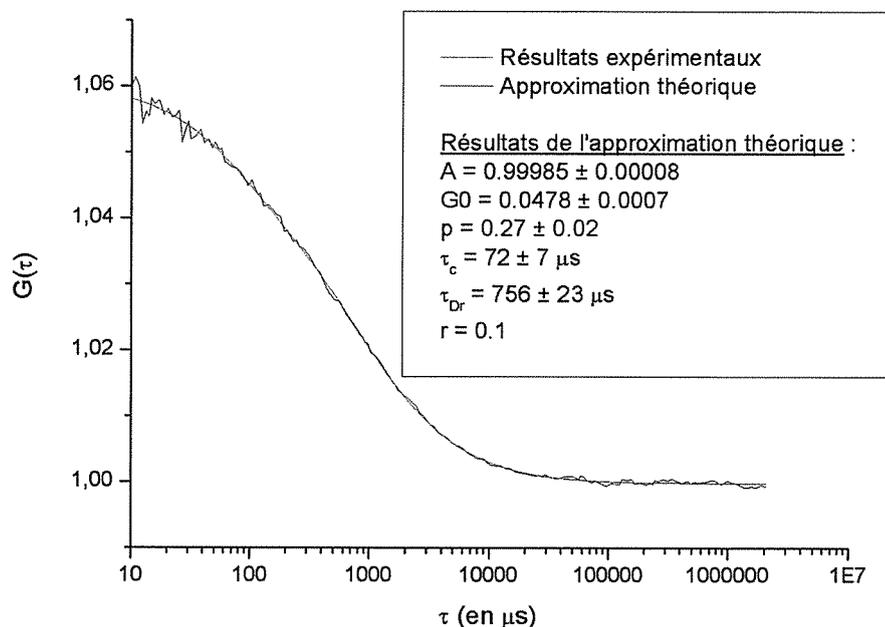


FIG. 37 – Autocorrélation du signal de fluorescence de la molécule d'OrgBapta5N dans une solution contenant environ  $205\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  et  $0\mu\text{M}$  d'EDTA.

L'obtention de la valeur du paramètre  $r$  en approchant la courbe expérimentale par la relation 3.26 laisse une grande incertitude sur la valeur de  $r$ . Nous avons donc choisi de fixer cette dernière en nous appuyant sur les travaux de Hess [64] et de Wilson [164]. On notera, par ailleurs, que, le choix de la valeur attribuée à cette variable n'influençant pas les résultats ayant trait aux paramètres dynamiques de la réaction chimique, nous n'avons pas cherché à mesurer celle-ci avec plus de précision.

Toutes les courbes d'autocorrélation obtenues à des concentrations d'EDTA plus importantes ont été analysées en prenant exactement le même jeu de valeurs pour ces paramètres qui sont considérés comme fixes d'une expérience à l'autre.

Ainsi, on peut estimer, à partir de ces résultats et de la calibration du volume focal présentée au paragraphe 5.4.2, le coefficient de diffusion de la molécule d'OrgBapta5N dans notre tampon ainsi que son rayon hydrodynamique. Le calcul conduit à un coefficient de diffusion  $D = 2,1 \cdot 10^{-11} \pm 0,4 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  et un rayon hydrodynamique  $R_h = 1,1 \pm 0,3 \text{ nm}$  compatible avec la valeur utilisée au paragraphe 5.2.4.

Il est également possible d'estimer le nombre moyen de molécules présentes dans le volume

focal effectif en posant l'égalité suivante (cf. eq. 3.7(b)) :

$$\langle N \rangle \simeq \frac{1}{G_D^0(0)} \left( \frac{\langle S_u \rangle}{\langle S_t \rangle} \right)^2 \quad (3.27)$$

Celle-ci tient compte du caractère non gaussien et du rapport signal utile moyen sur signal total moyen  $\frac{\langle S_u \rangle}{\langle S_t \rangle}$ . On calcule ce dernier en mesurant le signal de fond sur un échantillon sans OrgBapta5N que nous avons évalué à  $\langle B \rangle = 5000Cps$  et en prenant comme signal total la valeur moyenne du nombre de coups par seconde détectés sur un échantillon sans EDTA que nous avons évalué à  $\langle S_t \rangle = 127000Cps$ . La valeur du rapport signal sur bruit associé est  $\frac{\langle S_u \rangle}{\langle S_t \rangle} = \frac{\langle S_t \rangle - \langle B \rangle}{\langle S_t \rangle} = 97\%$ .

L'application numérique, en utilisant l'expression 3.27, conduit au résultat suivant :  $\langle N \rangle \simeq 20$  molécules, ce qui se rapproche du nombre optimal de molécules (17 molécules), calculé au paragraphe 6.1.2, en se rapportant à un volume focal gaussien-gaussien.

Afin de reproduire au mieux les courbes d'autocorrélation mesurées sur des échantillons à plus forte concentration d'EDTA, nous avons conservé les paramètres de diffusion fixes (ce qui ne laisse que deux variables d'ajustement  $p$  et  $\tau_c$ ), et avons utilisé l'expression 3.26 où les paramètres  $p$  et  $\tau_c$  sont défini comme suit :

$$\tau_c = (k_{on} + k_{off})^{-1} \text{ et } p = \frac{k_{off} \cdot k_{on} \left(1 - \frac{\eta_N}{\eta_B}\right)^2}{\left(k_{off} \frac{\eta_N}{\eta_B} + k_{on}\right)^2} \quad (3.28)$$

L'analyse des courbes expérimentales, présentées à la figure 38, à partir de ce modèle a

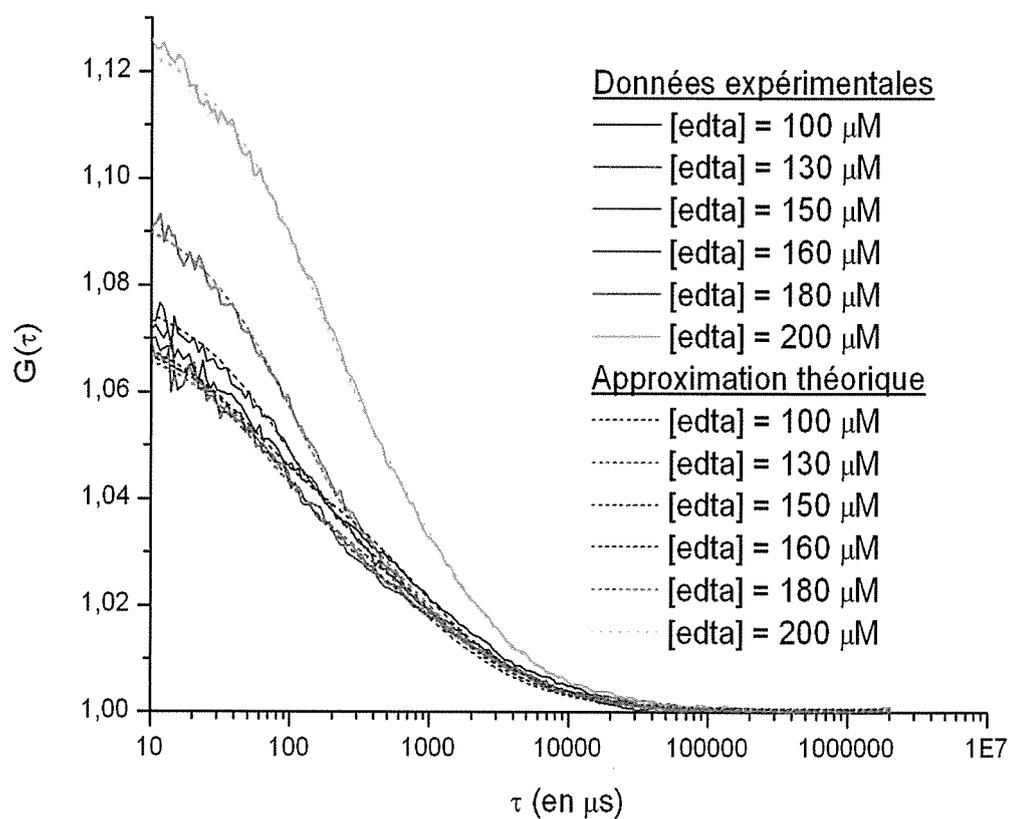


FIG. 38 – Courbes d'autocorrélation expérimentales acquises sur des solutions de concentrations variées en EDTA et donc en calcium libre.

fournit les valeurs de  $p$  et  $\tau_c$  regroupées dans le tableau 3.2 ci-dessous.

[EDTA] ( $\mu M$ )	$p$	$\Delta p$	$\tau_c$ ( $\mu s$ )	$\Delta \tau_c$ ( $\mu s$ )
100	0,5	0,05	49	5
130	0,6	0,06	62	6
140	0,68	0,07	76	7
150	0,76	0,08	78	8
160	0,78	0,08	84	9
170	0,85	0,09	97	10
180	1,07	0,1	100	10
190	1,07	0,1	200	20

**Tableau 3.2 : Évolution des paramètres  $p$  et  $\tau_c$ .**

Dans le cadre de nos expériences le rapport  $\frac{\eta_N}{\eta_B}$  est très faible, on peut raisonnablement négliger  $k_{off} \frac{\eta_N}{\eta_B}$  par rapport à  $k_{on}$ , et  $\frac{\eta_N}{\eta_B}$  par rapport à 1, donc réécrire  $p$  comme suit :

$$p \simeq \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (3.29)$$

On remarque sur la figure 38, comme dans le Tableau 3.2, que l'ordonnée à l'origine,  $G(0)$ , ou le facteur  $p$  liés par la relation  $G(0) = 1 + G_D^0(0) \cdot (1 + p)$ , (où  $G_D^0(0)$  est fixé par l'approximation de la courbe à  $0 \mu M$  d'EDTA) croissent avec la baisse de la concentration en calcium libre (augmentation de la concentration en EDTA).

En effet, lorsque la concentration en calcium libre diminue,  $k_{on}$  diminue,  $k_{off}$  reste constant et  $p$  augmente.

C'est à partir des valeurs de  $p$  et  $\tau_c$ , que nous avons calculé les paramètres chimiques  $k_{off}$  et  $k_{on}$  de l'OrgBapta5N, en utilisant les relations 3.13 et 3.29, et en gardant à l'esprit que pour la plus faible concentration en EDTA.

On écrit donc les expressions  $k_{on}$  et  $k_{off}$  en fonctions des paramètres  $\tau_c$  et  $p$ , ainsi que

l'erreur dont on doit tenir compte :

$$\begin{aligned} k_{on} &= \frac{(1-\frac{\eta_N}{\eta_B})^2}{\tau_c [p+(1-\frac{\eta_N}{\eta_B})^2]}, & \frac{\Delta k_{on}}{k_{on}} &= 4 \frac{\Delta \frac{\eta_N}{\eta_B}}{\frac{\eta_N}{\eta_B}} + \frac{\Delta \tau_c}{\tau_c} + \frac{\Delta p}{p} \\ k_{off} &= \frac{p}{\tau_c [p+(1-\frac{\eta_N}{\eta_B})^2]}, & \frac{\Delta k_{off}}{k_{off}} &= 2 \frac{\Delta \frac{\eta_N}{\eta_B}}{\frac{\eta_N}{\eta_B}} + \frac{\Delta \tau_c}{\tau_c} + 2 \frac{\Delta p}{p} \end{aligned} \quad (3.30)$$

À partir des données expérimentales, présentées au Tableau 3.2 et comme  $\frac{\eta_N}{\eta_B}$  est très petit devant 1, on obtient les résultats suivants :

[EDTA] ( $\mu M$ )	$k_{on}$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta k_{on}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$\Delta k_{off}$ ( $s^{-1}$ )
100	13 000	2 700	6 800	2 000
130	9 700	2 000	6 000	1 800
140	7 800	1 600	5 400	1 600
150	7 300	1 500	5 600	1 700
160	6 700	1 400	5 200	1 600
170	5 600	1 200	4 800	1 400
180	4 900	1 000	5 200	1 600

Tableau 3.3 : Évolution des paramètres  $k_{on}$  et  $k_{off}$ .

Les mesures sur les échantillons dont la concentration en EDTA est supérieure à  $180\mu M$ , fournissent des valeur de  $k_{off}$  s'éloignant trop fortement de celles présentées ci-dessus, nous ne les considérerons donc pas pour l'évaluation des paramètres chimiques de la molécules.

On peut évaluer  $k_{off}$  en prenant la moyenne des valeurs expérimentales déterminées à partir des échantillons de concentration en EDTA comprise entre 100 et  $190\mu M$  :  $k_{off} \simeq 5,6 \cdot 10^3 s^{-1} \pm 1,7$ .

En ce qui concerne  $k_{on} = \alpha [Ca^{2+}]_{libre}$ , on peut reprendre la démarche utilisée pour reproduire la courbe de saturation et utiliser l'expression de la concentration en OrgBapta5N complexé et en EDTA complexé,  $[EDTACa]_{eq}$  et  $[OrgCa]_{eq}$  (cf. eq. 3.20), pour calculer théoriquement l'évolution de  $k_{on}$  :

$$k_{on} = \alpha_{on} ([Ca^{2+}]_{init} - [EDTACa]_{eq} - [OrgCa]_{eq}) \quad (3.31)$$

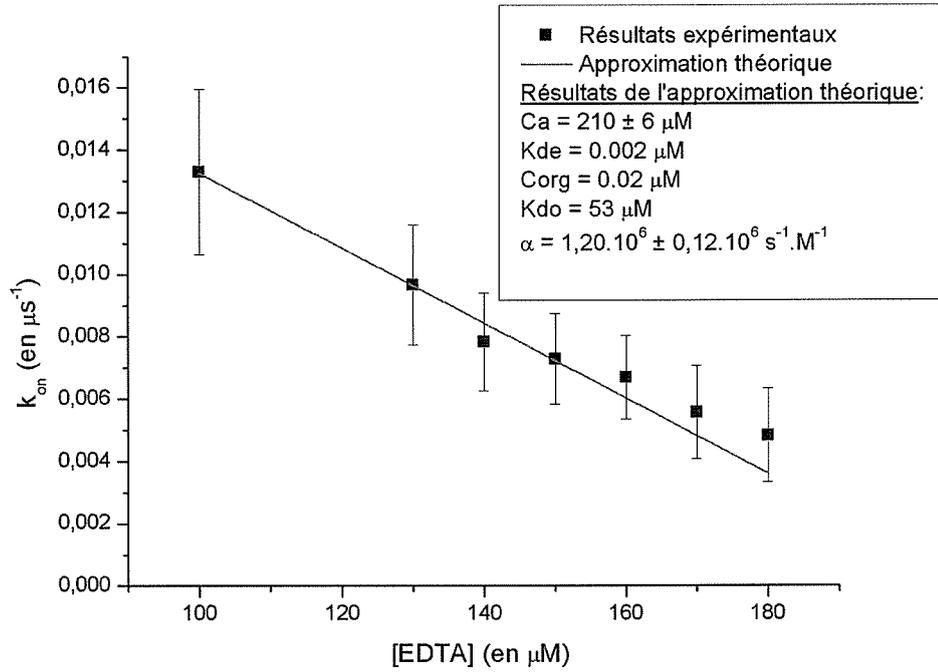


FIG. 39 – Comparaison des évolutions théoriques et expérimentales de  $k_{on}$  en fonction de la concentration en EDTA.

Le résultat de l'approximation des données expérimentales par la courbe théorique (cf. Figure 39) conduit aux conclusions suivantes :  $k_{on} = 1,2 \cdot 10^8 [Ca^{2+}]_{libre} \pm 0,12 \cdot 10^8 [Ca^{2+}]_{libre} s^{-1}$ , la concentration d'EDTA à l'équilibre du titrage, pour laquelle  $k_{on} = k_{off}$  est de  $170 \mu M$ . Ces résultats sont en accord satisfaisant avec les résultats présentés par Faas dans l'article [45].

Pour aller un peu plus loin, on s'intéresse à l'évolution du facteur  $p$ . On peut comparer les valeurs expérimentales, regroupées dans le tableau 3.2, aux courbes d'évolution théoriques calculées (cf. Figure 40) en s'appuyant sur l'intensité du signal mesuré  $S_F([EDTA]) \propto [Org - Ca]$ . Sachant qu'à l'équilibre du dosage,  $k_{on} = k_{off} = \alpha [Ca^{2+}]_{eq} = \alpha K d_{Org}$  et en estimant que, pour une concentration de  $0 \mu M$  d'EDTA, tout l'OrgBapta5N introduit initialement dans la solution,  $[Org]_{init}$ , est complexé, de sorte que  $S_F(0) \propto [Org]_{init}$ , alors  $p$  peut être modélisé de la façon suivante :

$$\begin{aligned}
 p([EDTA]) &= \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{\alpha K d_{Org}}{\alpha [Ca^{2+}]} = \frac{[Org]}{[Org - Ca]} = \frac{[Org]_{init} - [Org - Ca]}{[Org - Ca]} \quad (3.32) \\
 &= \frac{S_F(50) - S_F([EDTA])}{[S_F([EDTA]) - \langle B \rangle]}, \text{ avec } \langle B \rangle \text{ le signal de bruit de fond moyen.}
 \end{aligned}$$

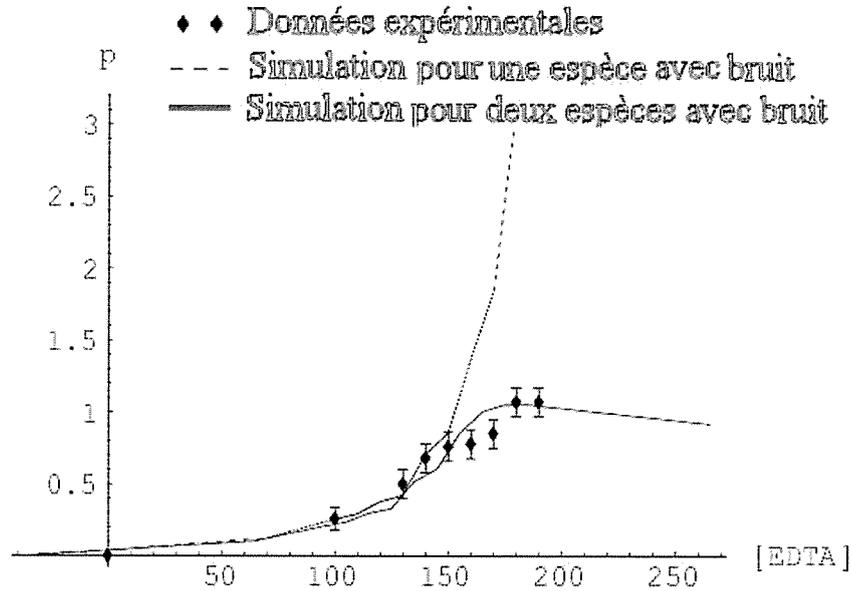


FIG. 40 – Comparaison entre évolution théorique et évolution expérimentale du facteur  $p$  en fonction de la concentration d'EDTA.

La courbe correspondant à ce modèle est tracée sur la figure 40 pour le cas d'un bruit moyen nul (pointillés). Sur cette même figure sont également reportées les données expérimentales (points). Les points correspondants aux concentrations d'EDTA inférieures à  $150\mu M$  suivent correctement l'évolution théorique. Cependant, lorsque l'on s'intéresse à l'allure de la courbe pour de plus fortes concentrations en EDTA (pour lesquelles l'état non complexé de l'OrgBapta5N devient plus important), on constate que l'écart entre les valeurs attendues et celles mesurées se creuse. On peut justifier ce phénomène en émettant l'hypothèse de la présence, dans nos solutions, d'une espèce dont l'efficacité de fluorescence serait indépendante de la concentration calcique. Afin de vérifier la validité de cette hypothèse, on introduit dans l'équation 3.32 un terme modélisant la présence d'une autre espèce fluorescente en plus faible proportion et dont la brillance est indépendante de la concentration calcique. Pour ce faire, nous allons comparer l'ordonnée à l'origine de la fonction d'autocorrélation dans le cas d'une autocorrélation dépendant d'une espèce,  $G_D^{1Esp}(0, [EDTA])$ , ou de deux espèces,

$G_D^{2Esp}(0, [EDTA]) :$

$$\begin{aligned}
 G_D^{1Esp}(0, [EDTA]) &= \frac{1}{N_1([EDTA])} \left[ \frac{b_1 N_1([EDTA])}{b_1 N_1([EDTA]) + \langle B \rangle} \right]^2 \\
 &= G_D^0(0) \cdot (1 + p^{1esp}) \\
 G_D^{2Esp}(0, [EDTA]) &= \frac{1}{N_1([EDTA])} \left[ \frac{b_1 N_1([EDTA])}{b_1 N_1([EDTA]) + b_2 N_2 + \langle B \rangle} \right]^2 \\
 &\quad + \frac{1}{N_2} \left[ \frac{b_2 N_2}{b_1 N_1([EDTA]) + b_2 N_2 + \langle B \rangle} \right]^2
 \end{aligned} \tag{3.33}$$

Où  $p^{1esp}$  correspond aux valeurs de  $p$  calculées d'après la courbe expérimentale en ne considérant que la molécule d'OrgBapta5N notée 1,  $N_1([EDTA])$  est le nombre de molécules d'OrgBapta5N brillantes pour une concentration d'EDTA donnée,  $N_2$  est le nombre de molécules de l'espèce fluorescente inconnue notée 2,  $b_1$  et  $b_2$  sont des facteurs dépendants de la brillance de la molécule considérée (1 ou 2) et de l'efficacité de détection et  $\langle B \rangle$  le bruit de fond moyen.

À partir des équations 3.33, on déduit une nouvelle expression de  $p^{1esp}$  en fonction de l'intensité du signal de fluorescence :

$$p^{1esp}([EDTA]) = \frac{b_1}{G_D^0(0)} \frac{S_1([EDTA])}{[S_{tot}([EDTA])]^2} + \frac{b_2}{G_D^0(0)} \frac{S_2}{[S_{tot}([EDTA])]^2} - 1 \tag{3.34}$$

Avec  $S_1([EDTA]) = b_1 N_1([EDTA])$ ,  $S_{tot}([EDTA]) = b_1 N_1([EDTA]) + b_2 N_2 + \langle B \rangle$ .

Pour comparer les valeurs expérimentales de  $p$  à celles déduites de l'expression 3.34, nous avons utilisé les valeurs numériques mesurées expérimentalement, telles que :  $S_2 = 5000 - \langle B \rangle$ ,  $S_1([EDTA]) = S_{tot}([EDTA]) - S_{tot}([EDTA] = 300\mu M)$  et  $\langle B \rangle = 300Cps$ , où  $S_{tot}([EDTA])$  représente le signal mesuré expérimentalement.

La Figure 40, montre que ce modèle retranscrit de façon plus satisfaisante la diminution du  $G(0)$ , inversement proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes simultanément présentes dans le volume focal. La conséquence directe de cette diminution serait donc la réduction de  $p$  par rapport au résultat escompté, les autres grandeurs mises en jeu dans l'expression de  $G(0)$  étant constantes. À partir du modèle décrit par l'équation 3.34, on obtient une évaluation des paramètres  $b_1$  et  $b_2$  tels que  $b_1 = 14500$  et  $b_2 = 7000$ . On peut ainsi se ramener à une valeur approchée des populations respectives des deux espèces de

molécules :  $N_1 = \frac{S_1}{b_1} \simeq 9$ ,  $N_2 = \frac{S_2}{b_2} \simeq 0,7$ . On peut vérifier qu'avec ces facteurs et en considérant un rapport 7 entre l'efficacité de fluorescence du niveau haut et du niveau bas, le rapport entre fond et niveau bas est cohérent.

La nature de ces molécules, dont la fluorescence n'est pas inhibée en absence de calcium libre, n'a pas été identifiée. Néanmoins, cette population dont l'efficacité de fluorescence est relativement importante, est constitué de molécules présentes dans le tampon (KCl, Tris, Glycérol). Jusqu'ici nous n'avons pas encore précisément identifié la nature de ces molécules, toutefois, nous avons pu acquérir leur spectre (présenté au paragraphe 6.1.4) et leur courbe d'autocorrelation.

Cette expérience nous a bien permis d'évaluer les paramètres chimiques de l'OrgBapta5N, ainsi que leur sensibilité aux variations de la concentration en calcium libre. Le bilan des résultats obtenus est en accord avec les informations extraites de la littérature [45]. En effet, nos mesures nous ont conduits à mesurer une constante de dissociation  $Kd_{Org}$  de l'OrgBapta5N de  $53 \pm 7 \mu M$ , les valeurs extraites de l'article de G. Faas étant  $Kd_{Org} = 29,3$  ou  $36,1 \mu M$  suivant le lot commercial d'OrgBapta5N utilisé. Nous sommes remontés aux paramètres  $k_{on}$  et  $k_{off}$  qui vérifient d'après nos expériences :  $k_{on} = 1,2 \cdot 10^8 [Ca^{2+}]_{libre} \pm 0,12 \cdot 10^8 [Ca^{2+}]_{libre} s^{-1}$ , et  $k_{off} = 5,6 \cdot 10^3 s^{-1} \pm 1,7 \cdot 10^3$ , et d'après les résultats de G. Faas,  $k_{on} = 2,4 \cdot 10^8 [Ca^{2+}]_{libre} s^{-1}$  ou  $2,6 \cdot 10^8 [Ca^{2+}]_{libre} s^{-1}$ , et  $k_{off} = 7,52 \cdot 10^3 s^{-1}$  ou  $8,52 \cdot 10^3 s^{-1}$  suivant le lot considéré. On remarque que, dans les deux cas, les ordres de grandeurs sont comparables et que l'écart entre nos conclusions et les leurs est tout à fait compatible avec les variations imputables aux différences dans la composition de nos milieux expérimentaux. Ainsi, nous avons démontré la faisabilité de l'étude d'un équilibre chimique à l'échelle de la molécule unique. Ces résultats restent semi-quantitatifs. Atteindre le quantitatif demande de porter un effort particulier dans les procédés de fabrication des échantillons, en utilisant des outils plus précis et performants hors de notre portée au moment de cette étude et coûteux.

## 7 L'expérience à deux photons

L'idée d'utiliser une excitation biphotonique en FCS et son application à l'étude de la diffusion de diverses particules en solution et dans des cellules de fibroblaste de souris, ont été rapportées pour la première fois en 1995 par Berland [14] et Mertz [93]. Les expériences

de FCS à deux photons (TPFCS) sont encore peu nombreuses [39][71][12][70], et centrées sur l'étude des variations de vitesse de diffusion. Cependant, elles présentent de nombreux atouts, en particulier pour les applications in vivo. On peut notamment souligner l'intérêt du confinement 3D intrinsèque à l'absorption à deux photons, ainsi que tous les avantages liés à l'écart entre longueurs d'onde d'absorption et d'émission et tout ce qui découle de ces deux particularités (cf. paragraphes 2.2.3 et 3.4). Cette partie vise à démontrer la faisabilité de l'application d'une excitation biphotonique à l'étude, par FCS, d'une dynamique chimique telle que celle étudiée précédemment à un photon. Les résultats présentés dans ce paragraphe sont issus d'expériences réalisées avant l'expérience qui fait l'objet des paragraphes précédents. A la fois la préparation des échantillons (viscosité des solutions, constituants) et le système optique étaient à l'époque moins optimisés. Le volume focal était en particulier plus grand, la fluorescence de l'indicateur partiellement bloquée par certains constituants de l'échantillon et l'efficacité de collection légèrement moins bonne. Il est donc difficile de comparer quantitativement les deux séries d'expériences surtout au niveau du rapport signal sur bruit.

## 7.1 Validation du système

La première étape de notre démarche expérimentale a bien évidemment été la validation du montage présenté au paragraphe 5.3. Pour ce faire, nous avons, comme pour l'étude à un photon, effectué l'acquisition du signal de fluorescence issu de la diffusion de molécules modèles. L'échantillon de référence est une solution de Rhodamine B dans l'éthylène glycol à une concentration de  $2.10^{-9}M$ . L'expérience effectuée avec une puissance excitatrice de  $20mW$  à  $815nm$  nous a permis d'obtenir la courbe d'autocorrélation présentée à la figure 41. Comme pour les expériences à un photon, nous avons vérifié systématiquement le bon alignement du montage, en effectuant l'acquisition rapide d'une courbe de diffusion de rhodamine B et en vérifiant la stabilité du niveau de signal ( $\simeq 10000Cps$ ) pour une concentration ( $2.10^{-9}M$ ) et une puissance excitatrice donnée ( $20mW$ ).

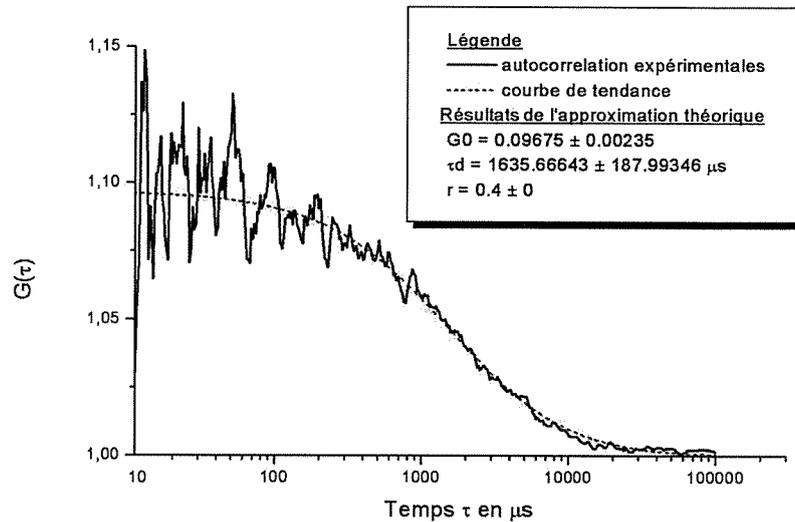


FIG. 41 – Courbe d'autocorrélation de la molécule de rhodamine B dans l'éthylène glycol, acquise avec une excitation biphotonique.

## 7.2 Calibration du volume focal

Afin de mesurer les dimensions du volume focal en excitation biphotonique, et de les comparer à celles du volume défini par l'excitation monophotonique (à l'époque nous avons  $\omega_r = 440nm$ ), nous avons fait l'acquisition du signal de diffusion Rayleigh de billes d'or (de chez BBInternational) de diamètres 20, 10 et 2nm ( $\pm 8\%$ ), en solution aqueuse, avec une excitation à 800nm et une puissance de 25mW (cf. Figures 42 et 43).

En opérant selon la procédure décrite au paragraphe 5.4.2 de ce chapitre, on peut, en considérant  $\omega_r = \frac{\omega_z}{10}$  (paramètre obtenu par ajustement théorique des courbes d'autocorrélation) et en utilisant la relation 3.21 valable pour un volume focal gaussien-gaussien, remonter aux dimensions de ce dernier, et les comparer à celles mesurées précédemment avec une

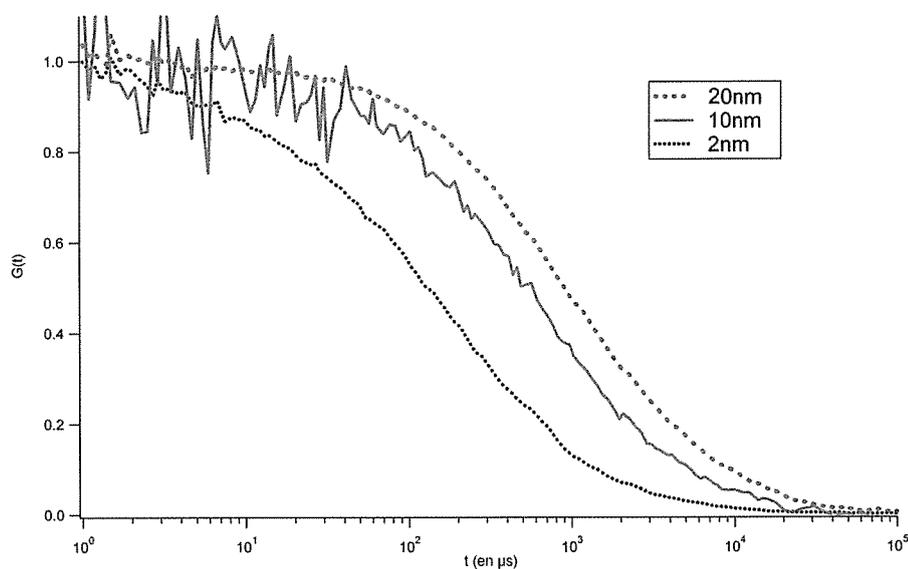


FIG. 42 – Courbes d'autocorrélation du signal de diffusion Rayleigh de billes d'or de diamètre 2nm, 10nm et 20nm.

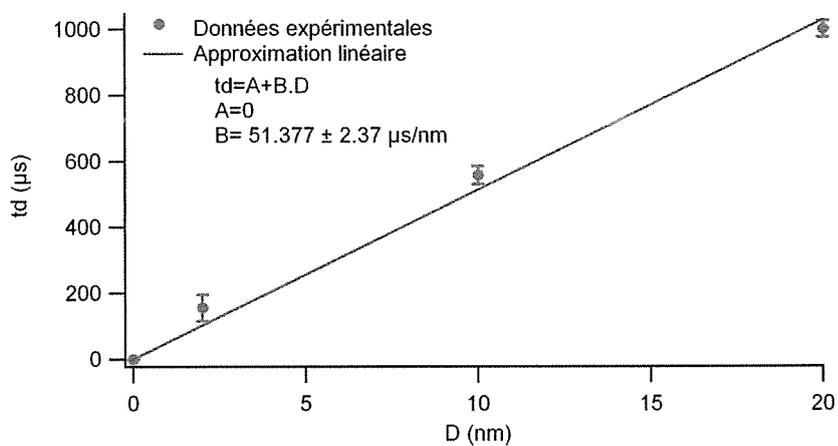


FIG. 43 – Étude de l'évolution du temps de diffusion en fonction du diamètre des billes.

excitation monophotonique :

	2 Photons	1 Photon
$\omega_r$ (nm)	$312 \pm 42$	$443 \pm 46$
$V_{eff}$ ( $\mu m^3$ )	$0,6 \pm 0.2$	$4,8 \pm 1.5$
$V_{eff}^{Th}$ ( $\mu m^3$ )	0,62	0,54

**Tableau 3.4 : Volumes effectifs à un et deux photons**

On vérifie bien que le volume expérimental diminue pour l'excitation biphotonique, le caractère confocal de ce dernier ne dépendant plus des dimensions du trou de filtrage qui dans notre cas est trop grand. Si on calcule théoriquement le volume,  $V_{eff}^{Th}$ , dans l'approximation gaussienne-gaussienne à un et à deux photons, en utilisant les expressions 2.31 et 2.32, on constate, d'une part, que le volume à un photon ne peut être considéré comme gaussien-gaussien (comme nous l'avons vu précédemment dans la partie 6 consacrée à l'étude monophotonique) et, d'autre part, que le volume expérimental à deux photons semble bien décrit par cette approximation, l'écart entre théorie et expérience étant relativement faible. Ainsi, on peut qualifier notre système de peu aberrant, celui-ci définissant un volume focal ne s'écartant que faiblement de la limite de diffraction.

### 7.3 Étude en longueur d'onde

Afin de déterminer la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption à deux photons, nous avons balayé la plage d'accordabilité de notre laser et avons mesuré le niveau de signal provenant d'un échantillon d'OrgBapta5N à forte concentration calcique ( $[Ca^{2+}] = 200\mu M$ ,  $[EDTA] = 0\mu M$ ), en vérifiant avec un spectromètre à fibre, que le profil spectral (et donc temporel) de l'impulsion restait le même. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 44. La longueur d'onde d'excitation, pour laquelle l'absorption est maximale, est centrée autour de  $805nm$ . Nous avons couplé cette étude avec une étude en puissance réalisée à différentes longueurs d'onde, d'une part, pour un échantillon à forte concentration calcique, mais également, pour un échantillon à très faible concentration calcique ( $[Ca^{2+}] = 200\mu M$ ,  $[EDTA] = 220\mu M$ ). Je présente à la figure 45 les résultats qui nous ont permis de conforter notre choix de longueur d'onde d'excitation ( $805nm$ ). Il s'agit des courbes d'évolution en

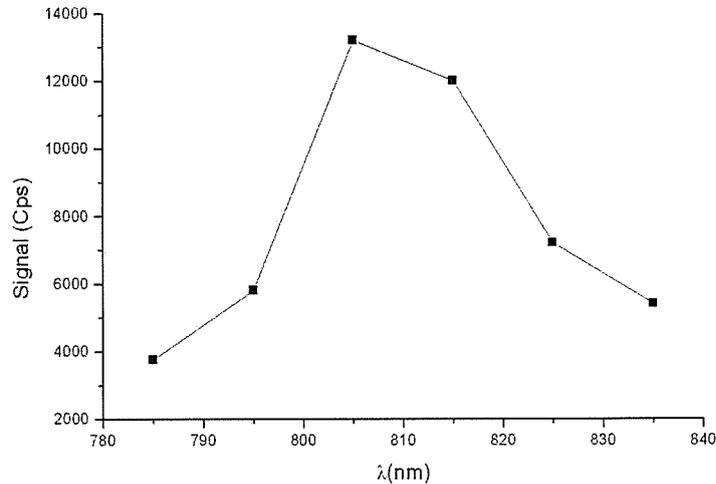


FIG. 44 – Évolution du signal de fluorescence de l'OrgBapta5N en fonction de la longueur d'onde d'excitation. La courbe correspond au signal mesuré sur un échantillon d'OrgBapta5N présentant une forte concentration en calcium libre ( $[Ca^{2+}] = 200\mu M$ ,  $[EDTA] = 0\mu M$ ).

puissance du signal mesuré sur les deux échantillons à forte concentration calcique,  $S_h$  (graphique(a)), et faible concentration calcique,  $S_b$  (graphique(b)), ainsi que le rapport  $S_h/S_b$  (graphique(c)), entre les niveaux de signal émis par ces deux échantillons. On constate une décroissance du rapport  $S_h/S_b$  avec l'augmentation de la puissance qui semble liée à la différence d'évolution des signaux émis par les deux échantillons avec la puissance. Le signal émis par l'échantillon à faible concentration calcique présente une augmentation du signal plus forte que celle du signal mesuré sur l'échantillon à forte concentration calcique. La variation du signal à faible concentration calcique, en présence uniquement d'OrgBapta 5N devant suivre celle du signal à forte concentration calcique, nous sommes de nouveau amenés à faire l'hypothèse de la présence d'une molécule fluorescente parasite dans nos solutions, dont le maximum d'absorption semble légèrement décalé vers  $815nm$ .

#### 7.4 Dosage de l'OrgBapta5N.

Afin d'aller plus loin dans notre démarche de vérification de la fiabilité du montage à deux photons, nous avons effectué le dosage de l'OrgBapta5N par l'EDTA, suivi en excita-

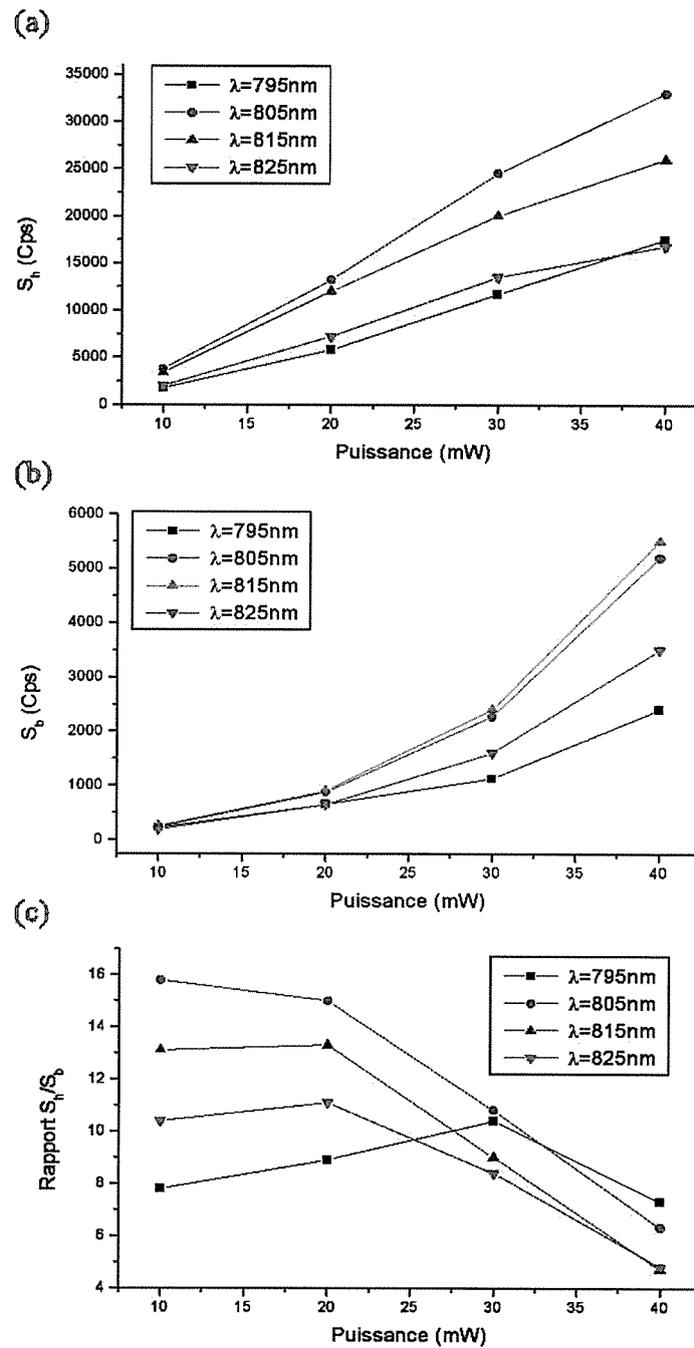


FIG. 45 – Étude en puissance, pour différentes longueurs d'onde, de l'évolution du signal émis par deux échantillons à forte et faible concentration calcique. Les graphiques (a) et (b) présentent respectivement une série de mesures réalisées sur un échantillon à forte, puis faible concentration calcique. Le graphique (c) présente le rapport entre signaux mesurés pour ces deux échantillons.

tion biphotonique. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus précédemment à un photon. Nous avons de nouveau évalué les constantes de dissociation de l'OrgBapta5N  $Kd_{OrgBapta5N}$  et de l'EDTA  $Kd_{EDTA}$ , en travaillant avec une puissance excitatrice de  $35mW$  à  $805nm$  et avec des échantillons dont la composition est la suivante :  $[Ca^{2+}] = 50\mu M$ ,  $[Org] = 1,3 \cdot 10^{-7}M$ ,  $[KCl] = 144mM$ , sucre à 30% en masse, EDTA variable (entre 0 et  $100\mu M$ ) et ajustement du pH à 8 par ajout de NaOH concentré. On notera que cette expérience, comme toutes celles que je présente dans cette partie, a été réalisée dans un milieu dont la viscosité est contrôlée par ajout de sucre.

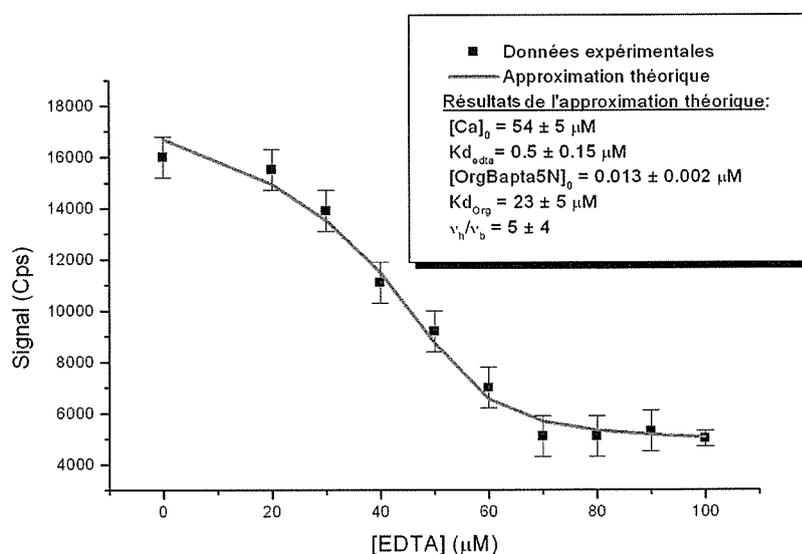


FIG. 46 – Titrage à deux photons de l'OrgBapta5N par l'EDTA.

Toutefois, malgré la perte de brillance imputable au sucre, nous avons pu obtenir la courbe de dosage présentée à la figure 46. On peut noter que les valeurs des  $Kd$  extraites de l'ajustement théorique des résultats expérimentaux sont bien en accord avec celles obtenues lors de l'expérience à un photon réalisée à cette époque :

	1 Photon	2 Photons
$Kd_{EDTA}$	$0,29 \pm 0,09\mu M$	$0,5 \pm 0,15\mu M$
$Kd_{OrgBapta5N}$	$27 \pm 5\mu M$	$23 \pm 5\mu M$

Tableau 3.5 : Valeurs de  $Kd$  extraites des expériences à un et deux photons

On vérifie, par ailleurs, sur cette courbe, que le rapport  $\eta_h/\eta_b$  est conforme à celui mesuré avec cette même puissance au cours de l'étude en longueur d'onde présentée au paragraphe précédent.

## 7.5 Étude de la saturation

Nous avons ensuite évalué le comportement de la sonde avec la puissance excitatrice. L'acquisition de la courbe présentée à la figure 47 a été faite sur un échantillon identique à celui décrit au paragraphe précédent et sans ajout d'EDTA (concentration calcique élevée), avec une puissance excitatrice variable à la longueur d'onde de  $805nm$ .

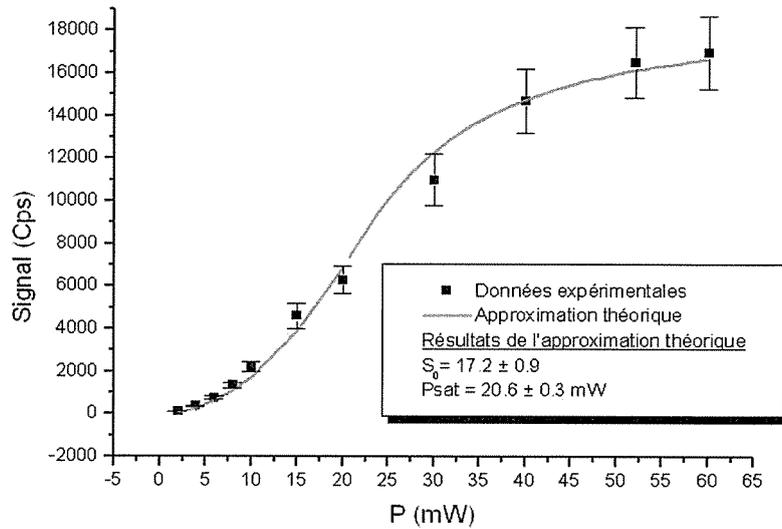


FIG. 47 – Courbe de saturation du signal de fluorescence en fonction de la puissance excitatrice à  $805nm$ .

L'ajustement théorique qui nous a permis de remonter à  $Psat$  tiré des travaux de K. Berland [13], est défini comme suit :

$$F^{1ph}(P) = \eta_D P^2 \phi_f \sigma_a^{2ph} \langle C \rangle V_{eff3DG} (1 - \alpha(P)^{\frac{5}{2}}) = S_0 \cdot P^2 (1 - \alpha(P)^{\frac{5}{2}}) \quad (3.35)$$

Avec  $\alpha(P) = \begin{cases} \frac{P^2 - P_{sat}^2}{P^2}, & \text{pour } P \geq P_{sat} \\ 1, & \text{pour } P < P_{sat} \end{cases}$  un facteur quantifiant l'écart au volume 3D gaussien  $V_{eff3DG}$  dû à l'apparition du phénomène de saturation,  $\eta_D$  l'efficacité de détection du système,  $\phi_f$  l'efficacité quantique de fluorescence,  $\sigma_a^{2ph}$  la section efficace d'absorption à deux photons,  $\langle C \rangle$  la concentration moyenne en molécules fluorescentes dans le volume focal,  $P$  la puissance excitatrice et  $P_{sat}$  la puissance de saturation. On notera que, dans le cadre de cette approximation,  $\phi_f$  et  $\sigma_a^{2ph}$  sont indépendants de la puissance, on exclut donc toute transformation chimique sous l'effet de la puissance. Nous avons ainsi pu évaluer la puissance de saturation  $P_{sat}$  à  $20,6 \pm 0,3 mW$ . On soulignera que lors de la mesure du volume focal, nous avons travaillé avec une puissance de 25mW très proche de la puissance de saturation. On peut donc considérer que dans cette expérience le volume focal est conforme à celui mesuré au paragraphe 7.2.

## 7.6 Vérification de la sensibilité de la technique

L'expérience qui fait l'objet de ce paragraphe vise à démontrer la possibilité d'utiliser une excitation biphotonique pour caractériser une sonde calcique. L'OrgBapta5N étant peu efficace à deux photons, nous avons travaillé avec une puissance excitatrice  $P = 45 mW$  supérieure à la puissance de saturation, afin de pouvoir mesurer la corrélation pour l'échantillon à très faible concentration calcique en un temps raisonnable (environs 20 minutes). Nous avons suivi la même démarche de mesure relative que pour l'expérience à un photon. Dans un premier temps, nous avons déterminé le temps de diffusion à partir de l'autocorrélation acquise sur un échantillon à forte concentration calcique ( $[EDTA] = 0 \mu M$ ,  $[Ca^{2+}] = 50 \mu M$ ,  $[Org] = 5 \cdot 10^{-9} M$ ,  $[KCl] = 144 mM$ , sucrose à 30% en masse, pH 8). En ajustant la courbe expérimentale par la fonction d'autocorrélation correspondant à une diffusion 3D gaussienne décrite par l'équation 3.4(a)), nous avons obtenu les résultats suivants :

$$G_D(0) = 0.070 \pm 0.005$$

$$\tau_D = 2050 \pm 80 \mu s$$

$$\frac{\omega_r}{\omega_z} = 0.1$$

On notera que le temps de diffusion est plus long que celui attendu. En effet, si l'on calcule le coefficient de diffusion de la molécule d'OrgBapta5N à partir de l'expérience à un photon sur la solution de glycérol avec une concentration d'EDTA de  $50\mu M$ , on obtient, en faisant l'approximation d'un volume gaussien-gaussien (cf. eq. 3.4(a)) :  $\tau_D^{1ph} \simeq 270\mu s$ , duquel on déduit (cf. eq. 3.5(a))  $D \simeq 1,8 \cdot 10^{-10} m^2 \cdot s^{-1}$ . On calcule le temps de diffusion à deux photons (cf. eq. 3.5(b)) associée à cette valeur du coefficient de diffusion :  $\tau_D^{2ph} = \frac{\omega_p^2}{8D} \simeq 670\mu s$ , pour notre molécule évoluant dans une solution dont la viscosité est d'environ  $2mPa \cdot s$ , peu différente des  $2,4mPa \cdot s$  de la solution de sucre à 30% en masse. On observe donc un écart d'un facteur trois entre le temps attendu et le temps mesuré, que l'on peut justifier par la présence potentielle d'aberration sphérique liée à une sous ou surcompensation de l'indice de réfraction de notre solution expérimentale, difficile à évaluer, mais également par la forte puissance de travail plus de deux fois supérieure à  $P_{sat}$ , toutes deux tendant à faire augmenter la taille du volume focal. Pour évaluer les contributions respectives de ces deux phénomènes, on peut se référer de nouveau à l'article de K. Berland [13] sur la saturation, dans lequel il évalue la modification du volume focal, noté  $V_{sat}$ , avec l'augmentation de la puissance lorsque l'on dépasse la saturation :

$$V_{sat} = V_{eff3DG} \frac{(1 - \alpha(P)^{\frac{5}{2}})}{1 - \alpha(P)} \quad (3.36)$$

Cette relation conduit à une augmentation du volume focal d'un facteur 2,2 par rapport à celui calculé au paragraphe 7.2 de ce chapitre. Ainsi, on en déduit que le phénomène principal contribuant à l'allongement du temps de diffusion est bien la puissance utilisée.

Quelle que soit la concentration calcique en solution, en considérant que la diffusion des molécules est inchangée, on peut conserver ces paramètres pour l'approximation de la courbe acquise sur un échantillon à faible concentration calcique ( $[EDTA] = 50\mu M$ ,  $[Ca^{2+}] = 50\mu M$ ,  $[Org] = 5 \cdot 10^{-9} M$ ,  $[KCl] = 144mM$ , sucre à 30% en masse, pH 8). La courbe d'ajustement définie par insertion de l'équation 3.12(a) dans la relation générale 3.8, nous a fourni les

résultats suivants :

$$G_D(0) = 0.070 \pm 0.005$$

$$\tau_D = 2050 \pm 80 \mu s$$

$$\frac{\omega_r}{\omega_z} = 0.1$$

$$p = 12.5 \pm 0.2$$

$$\tau_c = 55 \pm 2 \mu s$$

Les courbes correspondant à ces deux autocorrélations et les courbes théoriques correspondantes sont présentées à la figure 48. Malgré l'augmentation de la puissance et le long temps d'acquisition, on constate que ces courbes sont très bruitées et que l'augmentation de l'ordonnée à l'origine pour l'échantillon à faible concentration calcique est très forte au regard de la concentration utilisée. Afin d'expliquer ceci, on peut émettre l'hypothèse d'une photodégradation liée à la forte puissance utilisée pour l'excitation biphotonique faisant diminuer le nombre moyen de molécules fluorescentes présentes dans le volume focal.

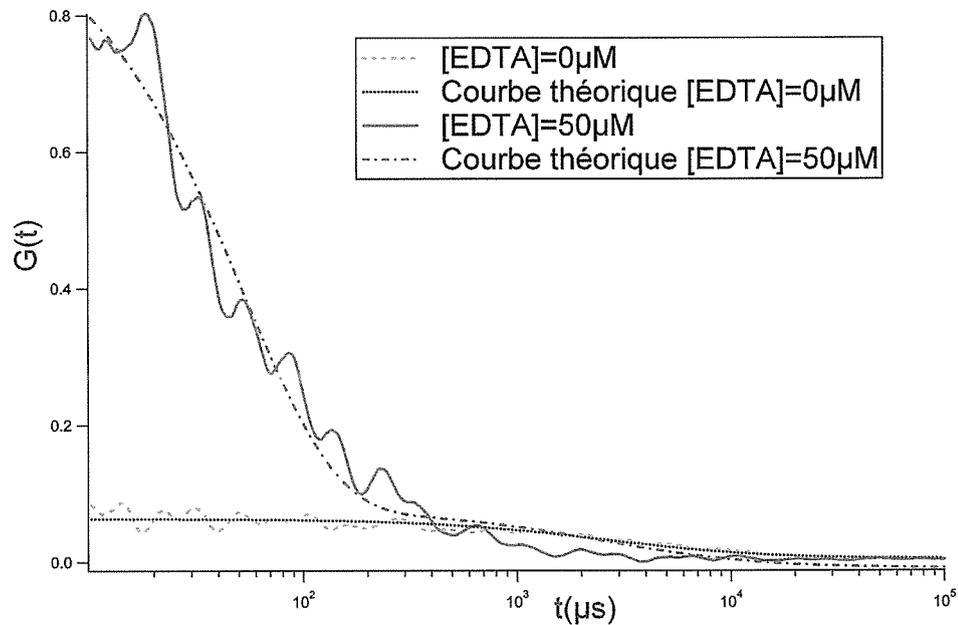


FIG. 48 – Comparaison des courbes d'autocorrélation acquises avec une excitation biphotonique sur des échantillons à faible ( $[EDTA] = 50 \mu M$ , courbes bleues et roses) et forte ( $[EDTA] = 0 \mu M$ , courbes vertes et noires) concentration calcique.

Malgré la faible brillance de la sonde que nous avons étudiée, et tous les points de l'expérience à encore améliorer (présence du sucre dans les solutions, amélioration du protocole

expérimental, effectué depuis dans le cadre des études à un photon), nous avons pu détecter l'effet de la réaction chimique. Ceci laisse penser qu'avec une sonde optimisée à deux photons et les nouvelles améliorations apportées au montage et au protocole expérimental, il serait possible de réaliser une étude aussi poussée que celle que nous avons faite avec l'excitation monophotonique.

l'origine de fluctuations majeures du signal détecté [143], qui peuvent conduire à une perte de quantitativité, au point qu'elle n'autorise plus qu'une mesure de type binaire : je détecte des molécules, ou je n'en détecte pas. Ainsi la suppression de ces étapes de préamplification est un enjeu majeur auquel l'approche "molécule unique" peut apporter une alternative.

Je vais, à présent, vous présenter les développements que j'ai effectués afin de quantifier des signaux de fluorescence émis par des échantillons marqués par hybridation-in-situ, en employant cette approche. Dans un premier temps, j'exposerai le contexte de cette expérience à savoir l'étude des gènes de mémoire et de leur expression chez la drosophile, puis je présenterai l'hybridation-in-situ et les progrès réalisés vers une mesure de type molécule unique.

## 8 L'expérience et son contexte

### 8.1 Contexte et enjeux biologiques

La mémoire est le plus simple des processus cognitifs. Elle est fortement affectée par les pathologies neurodégénératives liées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer. Son étude présente donc un grand intérêt dans la compréhension et le traitement de ces dernières. La mémoire peut être étudiée à différentes échelles : celle de l'individu par son comportement (psychologie), celle des réseaux neuronaux par étude de l'anatomie (organes clefs, groupement de cellules impliquées dans la mémorisation), celle de la cellule en particulier par l'étude de ses changements de morphologie (plasticité synaptique) et enfin, à l'échelle moléculaire par l'étude des gènes requis pour la mémoire (structure et fonctionnement de ces acteurs de la mémoire, les protéines).

De nombreux travaux ont été et sont menés pour comprendre les processus d'interaction entre protéines [132], pour déterminer la structure de ces molécules très complexes souvent intimement liée à leurs propriétés, ou encore pour analyser à l'échelle moléculaire, comme cellulaire [65], leur fonctionnement. D'autres expériences, réalisées à l'échelle anatomique [24], visent à comprendre la structure des organes mis en jeu. Cependant, aucune de ces expériences ne permet de corréler l'étude des processus cellulaires directement avec la cartographie anatomique des centres clefs impliqués dans ces mécanismes.

Les mammifères sont les modèles animaux les plus utilisés pour l'étude de la mémoire. Malheureusement, chez ces derniers, la complexité du réseau neuronal (l'homme possède 100 milliards de neurones,  $10^{14}$  synapses!), la taille même du cerveau et les différences d'échelles mises en jeu sont telles qu'il est difficilement envisageable d'avoir une approche intégrative. Il est, à l'heure actuelle, impensable d'observer l'ensemble du réseau neuronal avec une résolution cellulaire puisqu'aucun système n'en est capable.

L'utilisation de la drosophile *Drosophila melanogaster* comme système modèle, dans les études de mémoire, a révolutionné ce domaine de recherche. Si étonnant que cela puisse paraître, 50% des gènes humains possèdent leur pendant (orthologue) chez la drosophile. De plus les individus de cette espèce possèdent de réelles et surprenantes capacités d'apprentissage et de mémorisation, comme la reconnaissance d'odeurs ou de couleurs. Outre leur intérêt fondamental, ces études sont pertinentes pour la compréhension de nombreux mécanismes chez les mammifères puisque plusieurs des voies de signalisation principales de la mémoire sont conservées des invertébrés aux mammifères : voies AMP cyclique, pKa, plusieurs voies d'adhésion cellulaire et du cytosquelette, de nombreux neurotransmetteurs et leurs récepteurs membranaires. Son génome, légèrement plus restreint (13 601 gènes) est depuis l'an 2000 entièrement séquencé [2], et surtout, des outils génétiques inégalés chez les modèles mammifères ont été développés (des dizaines de milliers de mutants sont désormais disponibles commercialement) et les manipulations génétiques pour en créer de nouveaux sont rapides : il faut environ trois à six semaines pour obtenir une drosophile mutante contre au moins six mois pour une souris, quand la transformation se déroule bien. Enfin, elle présente des avantages majeurs pour les études optiques. La taille de son cerveau n'est que d'environ 500 microns, celle de ses cellules, de l'ordre de quelques microns et son réseau neuronal est d'une grande simplicité, seulement 20 000 neurones dans la région centrale du cerveau, comparé à celui des petits mammifères comme la souris. Ces échelles rendent possibles, grâce aux techniques d'imagerie optique, des études simultanément à l'échelle du réseau neuronal et à celle des cellules, voire des protéines. C'est un système unique pour une étude intégrative, en partant du niveau moléculaire pour aller jusqu'au comportement.

C'est dans cet esprit, dans le cadre d'un projet plus global sur l'étude des phases de mémoire de la drosophile [66], mené par l'équipe de biologistes du laboratoire de Neurobiologie et Diversité cellulaire de l'ESPCI avec lesquels nous avons collaboré, que nous nous sommes

intéressés à la cartographie des gènes intervenant dans les processus de mémorisation et à l'évolution spatiale comme temporelle de leur expression. En effet, bien que la mémoire soit individuelle et en grande partie indépendantes du baguage génétique de chaque individu, sa mise en place requiert de nombreuses protéines. L'expression de ces dernières peut être renforcée, ou au contraire réprimée, lors de la formation et la consolidation de la mémoire. Nous proposons de développer une méthode d'hybridation-in-situ<sup>28</sup> (HIS) [82] semi-quantitative, ainsi que le dispositif optique optimisé indispensable à l'aboutissement d'un tel projet. Ainsi nous espérons pouvoir accéder, non seulement, à la nature et à la dynamique de certains processus moléculaires impliqués dans l'établissement de la mémoire, mais également, à l'organisation du réseau neuronal, en cartographiant l'expression de gènes impliqués (approche Bottom-up).

## 8.2 La mémoire olfactive chez la drosophile

### 8.2.1 Le comportement

L'étude du comportement est une approche qui reste incontournable pour vérifier l'instauration d'une forme de mémoire et la quantifier. La mémorisation associative est une des formes de mémorisation, démontrée chez la drosophile, qui s'adapte bien à une telle évaluation qualitative. L'évaluation de la mémoire requiert deux étapes : le conditionnement et un test.

Un tel protocole a été introduit pour la première fois en 1974 par W. G. Quinn, W. A. Harris et S. Benzer [118]. Le principe du conditionnement olfactif de la drosophile est fondé sur l'association d'une odeur et d'un choc électrique. Les mouches pour lesquelles l'apprentissage a été fructueux vont avoir tendance à éviter cette odeur, même en l'absence du choc. Le dispositif expérimental, T-Maze, associé à cet apprentissage est simple, il est constitué de tubes recouverts de grilles électrisables, dans lesquels l'expérimentateur place une population d'individus sauvages (non mutés) ou mutants, y fait diffuser une odeur et y déclenche (ou non) un stimulus électrique. Le principe du conditionnement consiste dans une

---

<sup>28</sup>L'hybridation in-situ est une technique de biologie moléculaire qui utilise la complémentarité des bases des acides nucléiques pour localiser l'un d'entre eux au sein d'un tissu (in situ) par association (hybridation) d'une sonde (acide nucléique) de séquence choisie pour être complémentaire de celle de l'acide nucléique recherché.

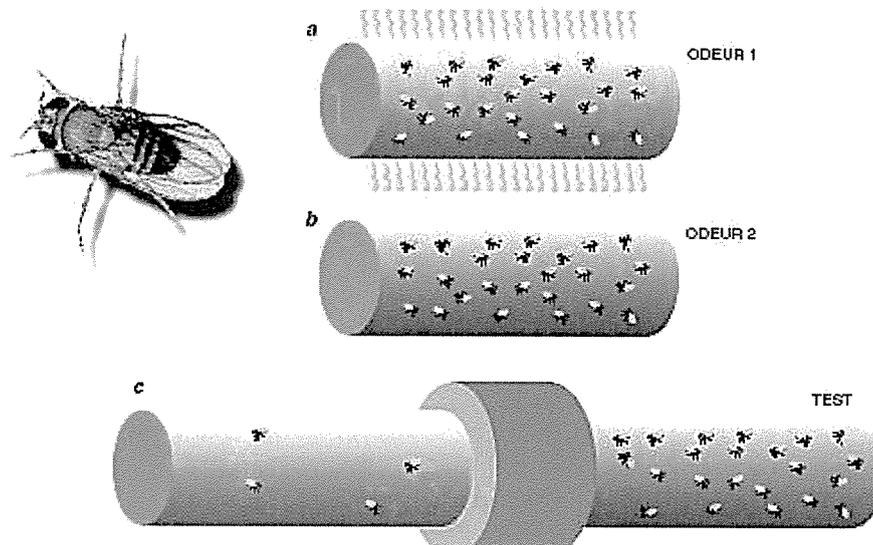


FIG. 49 – Principe du conditionnement olfactif des drosophiles.

Dans le tube (a) est diffusée une odeur 1 associée à un choc électrique, dans le (b) est diffusée une odeur 2 sans choc électrique. Le tube (c) correspond au dispositif de test de l'efficacité de l'apprentissage et est composé de deux tubes communicants contenant respectivement l'odeur 1 sans choc électrique et l'odeur 2. Schéma extrait de l'article "Mémoire de mouche" de Raphaël Hitier, Florian Petit et Thomas Prétat, publié dans *Pour la science*, dossier 31 (2001) [119].

première étape à soumettre une population A de mouches à une odeur 1 à laquelle on associe simultanément un choc électrique ; puis à soumettre cette même population A à une odeur 2, à laquelle on n'associera aucun choc. Afin d'éviter le biais introduit par la préférence de la mouche pour l'une des deux odeurs, le même test est réalisé sur une population de mouches B, identiques à celles constituant la population A, mais cette fois-ci, en associant le choc électrique à l'odeur 2 et non à l'odeur 1. Vient ensuite la seconde étape dite de test. Les deux populations de mouches sont successivement placées dans un tube à l'intérieur duquel elles peuvent se déplacer librement dans deux compartiments contenant chacun l'une des deux odeurs utilisées pour le conditionnement, mais cette fois en l'absence de choc. À l'issue de ce test, l'expérimentateur comptabilise les mouches contenues dans chaque compartiment. Les différences entre le pourcentage des mouches ayant choisi d'éviter l'odeur associée au choc et le pourcentage des mouches ayant fait le choix inverse permet de quantifier la mémoire gardée de l'association entre l'odeur et le choc électrique. Cette mesure varie suivant le délai, les éventuelles répétitions de l'étape 1, et l'origine des populations testées (sauvages ou mutantes). On peut ainsi mesurer le déclin de la mémoire, tester l'impact des mutations sur les compétences des individus, ...

### 8.2.2 Cycle et circuit de la mémoire olfactive

Chez la drosophile, on peut, de façon schématique, distinguer trois phases de mémoire (cf. Figure. 50) qui ont des supports biologiques différents et peuvent éventuellement se recouvrir en partie dans le temps. On distingue la mémoire à court terme (STM, *Short Term Memory*), observée jusqu'à une heure après le conditionnement, la mémoire à moyen terme (ARM, *Anesthesia Resistant Memory*) qui peut persister jusqu'à 48 heures et qui, contrairement à la mémoire à court terme, ne s'efface pas suite à l'anesthésie de la mouche et enfin une mémoire à long terme (LTM, *Long Term Memory*) qui peut subsister pendant plus d'une semaine et qui nécessite des synthèses protéiques après conditionnement.

La mise en place de ces mémoires s'effectue grâce à l'action d'un grand nombre de protéines. Par exemple, sont connues *dunce*, *rutabaga*, *amnesiac*, CREB, *radish*, *fasciclin II* et *crammer* [158][173][90][27] qui sont respectivement une cAMP phosphodiesterase, une adénylyle cyclase, probablement un neuropeptide, un facteur de transcription, une protéine dont la fonction n'est pas identifiée, une protéine régulant dans le cytosquelette et une cystéine

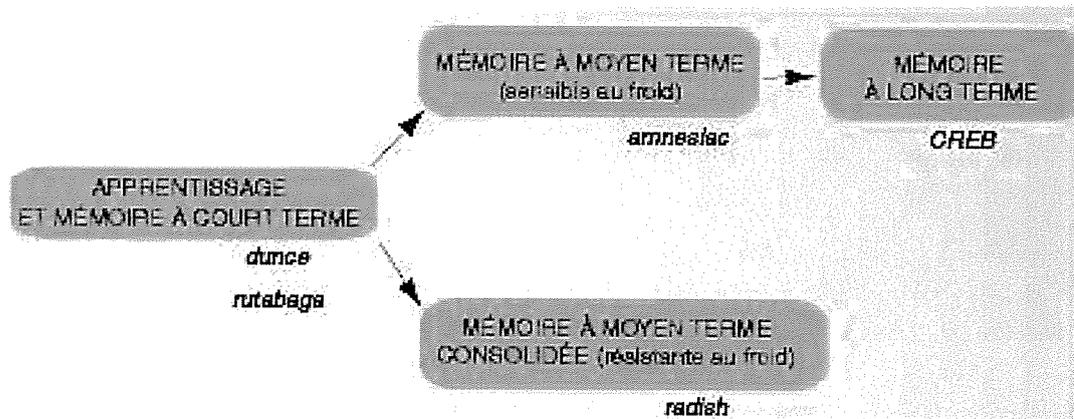


FIG. 50 – Schématisation des différents types de mémoire chez la drosophile et de leur stabilité.

Schéma extrait de l'article "Mémoire de mouche" de Raphaël Hitier, Florian Petit et Thomas Préat, publié dans *Pour la science*, dossier 31 (2001) [119].

protéase, ce qui démontre la grande diversité des protéines mises en jeu. On notera que tous ces gènes portent les noms de mutants ayant montré des déficiences dans certaines phases de mémoire. Parmi les mutants étudiés, certains gènes, comme *radish* n'ont pas encore été bien identifiés, on ne sait ni où ils s'expriment, ni quel réseau les contrôle. D'autre, comme *rutabaga* [173] et *crammer* [27], ont permis de valider le rôle de certaines régions du cerveau dans la mémoire olfactive. Ainsi, les mutants *crammer* ont conduit à prouver l'importance des corps pédonculés dans les processus de mémorisation à long terme [27]. Toutefois, la cartographie des zones de mémoire du cerveau des drosophiles est loin d'être achevée et la vérification de l'implication présumée de nombreux gènes dans la mémoire olfactive reste encore à faire. En se cantonnant aux zones identifiées, on peut tout de même, en partie (la partie initiale), reconstituer le circuit que parcourent une odeur et le message nerveux en se référant à la figure 52. Je ne présenterai que schématiquement la partie du cerveau concernée par ces études.

Le message nerveux, lié à la détection d'odeurs par les antennes de la drosophile, est initié au niveau des neurones (cf. Figure 51) récepteurs olfactifs situés dans le troisième segment antennal. Celui-ci est ensuite transmis aux lobes antennaires via les nerfs antennaux. Les neurones de projection ou neurones relais prennent alors la suite pour acheminer l'informa-

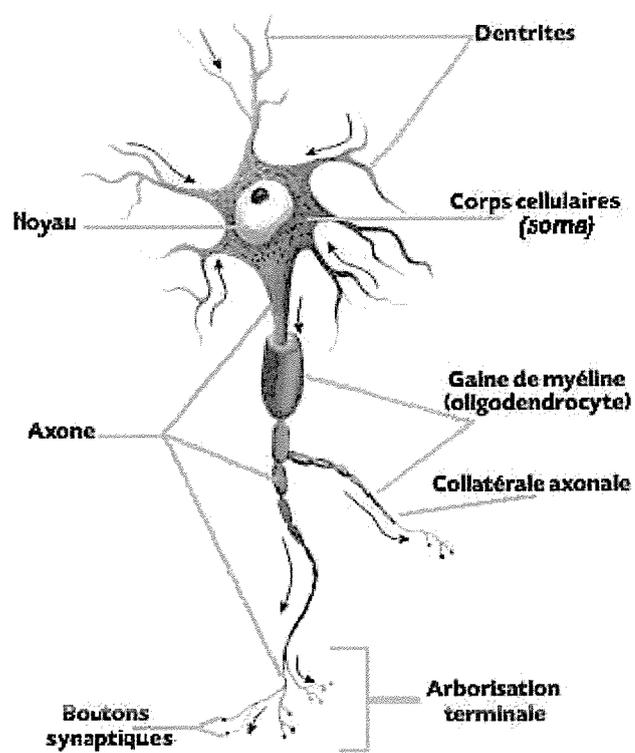


FIG. 51 – Schéma d'une cellule neuronale

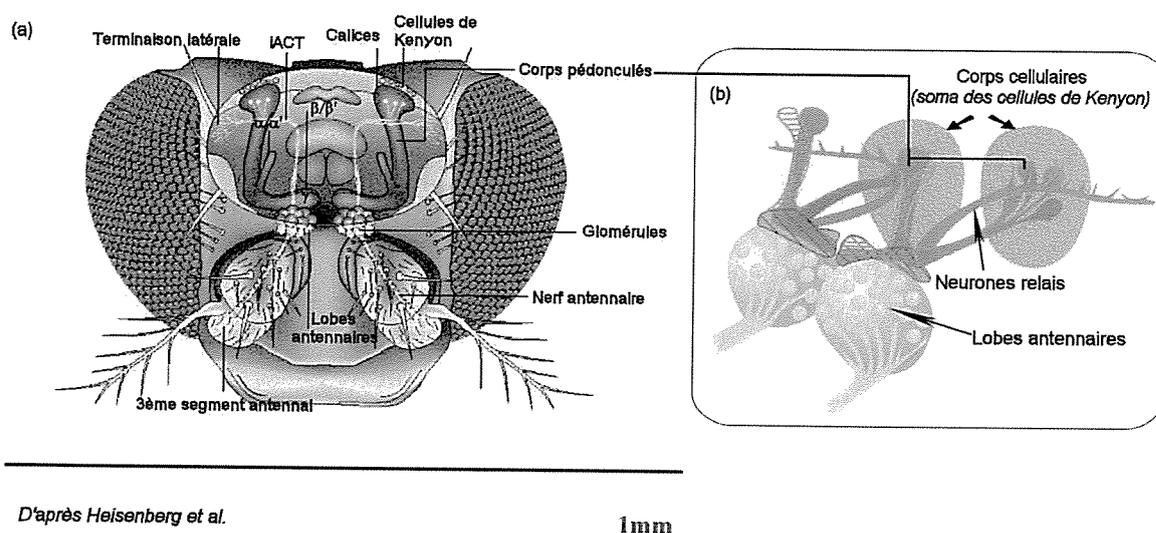


FIG. 52 – Schématisation du circuit neuronal de la mémoire olfactive dans un cerveau de drosophile. (a) Zone du cerveau consacrée à la transmission et à l'enregistrement du message olfactif. iACT : circuit antennaire cérébral interne. (b) Zoom sur les corps pédonculés, un des centres de la mémoire olfactive. Le schéma (b) est extrait de l'article "Mémoire de mouche" de Raphaël Hitier, Florian Petit et Thomas Préat, publié dans *Pour la science*, dossier 31 (2001) [119].

tion vers les calices (cf. Figures 52 et 51) des corps pédonculés ou dendrites des cellules de Kenyon (cf. Figure 52) via le circuit antennaire cérébral interne (iACT). Le soma (corps cellulaire) de ces cellules neuronales est situé dans la partie dorsale postérieure du cerveau. Les corps pédonculés (représentés en violet sur la figure 52) constitués des axones des cellules de Kenyon ont été identifiés à plusieurs reprises comme étant un centre clef de la mémoire olfactive à court terme [173] comme à long terme [109], pour l'apprentissage, la restitution et la consolidation de la mémoire [91]. Dans les premières expériences que je décrirai notre attention s'est portée principalement sur cette zone du cerveau.

### 8.3 Etat de l'art dans l'étude des gènes

#### 8.3.1 Les gènes acteurs de la mémoire

Comme souligné précédemment, l'apparition de la mémoire est induite par l'action de certaines protéines. Ces protéines sont synthétisées lorsque l'expression du gène correspondant est activée. Ainsi, comme on peut le voir sur la figure 53, dans une cellule donnée, les gènes

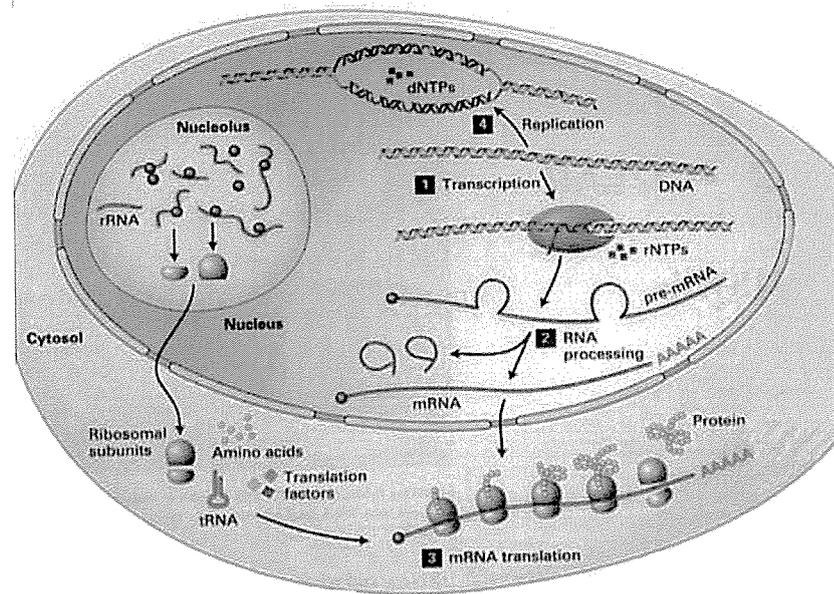


FIG. 53 – Les différentes étapes de la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes.

devant être exprimés sont transcrit en une séquence d'ARN messenger (ARNm) qui, dans le cytoplasme, va à son tour être traduite en une protéine. L'étude de la mémoire passe donc par celle des gènes et des protéines. Contrairement à l'ADN, présent indifféremment dans toutes les cellules de l'organisme (cf. Figure 53<sup>29</sup>), les brins d'ARNm codant pour un gène donné sont synthétisés spécifiquement dans les cellules où le gène doit être exprimé et ce dans des proportions différentes selon le niveau d'expression attendu. L'ARN constitue donc l'ultime intermédiaire avant la protéine. La quantité d'ARN dans une cellule donnée est généralement représentative de l'activité du gène pour lequel il code, le marquage de ce dernier est donc une alternative au marquage direct des protéines.

À l'heure actuelle, il existe un certain nombre de techniques disponibles pour étudier l'expression des gènes. Les techniques de biologie moléculaire telles que le Western ou Northern blot<sup>30</sup> et les puces à ADN<sup>31</sup> permettent d'obtenir des informations quantitatives sur l'expres-

<sup>29</sup> Une cellule eucaryote est une cellule possédant un noyau, comme celles constituant les organismes pluricellulaires. Dans le cas contraire, on parle de cellule procaryote comme les bactéries.

<sup>30</sup> Ce sont deux méthodes de biologie moléculaire inventées par Edwin Southern permettant de marquer l'ADN (Southern blot) ou l'ARN (Northern Blot) par des bases radioactives ou fluorescentes et de détecter les fragments d'intérêt par électrophorèse.

<sup>31</sup> Cette technologie provient d'une adaptation du Southern Blot. Elle consiste à extraire les ARNs totaux

sion des gènes, mais ne permettent pas de cartographier leurs zones d'expression. Plusieurs gènes de mémoire ont, d'ores-et-déjà, été identifiés, grâce à des techniques de mutagenèse couplées à des tests comportementaux permettant de taire ou d'amplifier l'expression d'un gène, rendant ainsi possible la comparaison des capacités de mémorisation des individus présentant une mutation spécifique avec celles d'une population d'individus non mutés.

Pour localiser l'expression d'un gène en particulier, les biologistes disposent de deux alternatives. La première, a priori la plus satisfaisante, puisqu'elle vise directement les protéines, consiste à synthétiser des sondes protéiques spécifiques de chaque protéine étudiée (immunohistochimie). Elle permet une détection des protéines ciblées, par microscopie optique ou électronique. Toutefois, cette technique qui nécessite la fabrication d'anticorps spécifiques est un travail de longue haleine et dont les résultats sont loin d'être garantis. Comme les recherches sur les processus de mémoire impliquent l'étude de centaines de gènes, l'utilisation de cette technique ne semble pas envisageable. La seconde, celle que nous avons mise en oeuvre au cours de ma thèse, est l'hybridation-in-situ.

### 8.3.2 L'hybridation-in-situ

L'hybridation-in-situ (HIS) [82] fait appel à des sondes, séquences d'acides nucléiques marquées, pour mettre en évidence et localiser, dans les cellules ou les tissus, des séquences d'acides nucléiques complémentaires de la sonde (ADN ou ARN). L'HIS est un outil incomparable pour étudier l'expression des gènes, mais reste une technique très délicate à mettre en oeuvre. En effet, elle nécessite aussi bien des connaissances en biologie cellulaire qu'en histologie, et s'appuie sur un protocole complexe mettant en jeu de nombreuses étapes, chacune d'elles devant être optimisée spécifiquement pour une expérience donnée. L'HIS fut introduite pour la première fois en 1969 [82] par Gall et Pardue qui détectèrent, par autoradiographie, des brins d'ADN ribosomal marqués par des sondes ARN [50] puis ADN [51] radioactives. Malgré les nombreux inconvénients liés à l'utilisation de sondes radioactives (sondes instables, résolution limitée, pas de quantification possible, nécessité de réaliser de longues acquisitions, prix et dangerosité des produits utilisés, ...), elle fut longtemps la seule alternative. Il fal-

---

des cellules ou organismes étudiés, à les amplifier puis à les transcrire en ARNs complémentaires marqués par des chromophores et, enfin, à apposer ces derniers sur une puce à ADN. Cette puce à ADN est un ensemble de molécules d'ADN fixées sur une surface, afin de détecter les proportions respectives des différents gènes exprimés.

lut attendre 1980 [11], pour que soit décrite la première hybridation-in-situ par fluorescence (FISH). Cette nouvelle technique de marquage a permis, d'une part, de limiter les risques de manipulation, d'autre part, d'améliorer la résolution spatiale et la rapidité de détection. Par rapport aux autres techniques de biologie moléculaire telles que le Western ou Northern blot et les puces à ADN, elle permet d'obtenir des informations topologiques, comme par exemple la localisation de gènes dans les chromosomes [120]. La technique d'hybridation-in-situ la plus utilisée est l'hybridation avec amplification enzymatique (CARD, *Catalyze Reporter Deposition* [143]). Le principe de cette technique [31] (cf. Figure 54) consiste à hybrider l'ARN cible par la séquence d'acides ribonucléiques (ribosonde) adaptée, laquelle est couplée chimiquement à des antigènes du type biotine. On introduit ensuite, par bains successifs, différents composés. Le premier bain contient un anticorps primaire de type streptavidine avec un antigène. Cet anticorps est capable de reconnaître l'antigène fixé sur la sonde ARN. Le second bain contient un anticorps secondaire relié à une enzyme de type HRP (*Horseradish Peroxidase*) ou phosphatase alcaline <sup>32</sup>. L'anticorps secondaire va alors se fixer sur l'antigène de l'anticorps primaire. Enfin, on introduit dans les tissus, ou la cellule, en quantité importante, un élément initialement non fluorescent. Dans les cellules hybridées ce produit devient fluorescent sous l'action de l'enzyme.

Cette technique d'hybridation par marquage fluorescent est une alternative beaucoup moins lourde que l'hybridation radioactive. Elle a ouvert la voie aux analyses en cellules vivantes et aux marquages multicolores [105]. Toutefois, elle est soumise au bruit lié à l'amplification. Ce bruit, dépendant des conditions expérimentales et de l'environnement cellulaire, rend donc le marquage quantitatif des cibles quasi-impossible. De plus, bien qu'efficace chez les mammifères et les larves de drosophiles [150], il n'existe encore aucun protocole de FISH reproductible chez la drosophile adulte [114][79].

Les progrès en microscopie et traitement des images post-acquisition, entre autres, ont rendu possible le développement d'un protocole de FISH sans amplification. On ne relève que peu d'expériences pour lesquelles ce nouveau protocole a conduit à des résultats concluants. Nous citerons l'expérience réalisée, en 1998, par Singer et son équipe [46] qui est parvenu à détecter, dans les cellules rénales de rats, des molécules d'ARN uniques marquées par des

---

<sup>32</sup>La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme hydrolytique, qui détache les groupements phosphates en position 5- et 3- de plusieurs types de molécules telles que les nucléotides, les protéines et les alcaloïdes. Ce processus est appelé déphosphorylation.

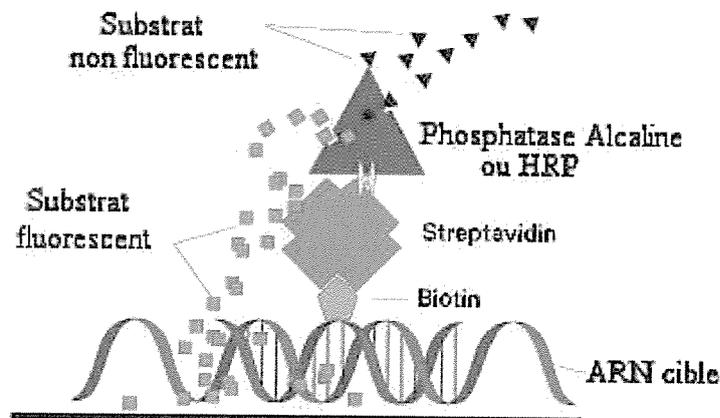


FIG. 54 – Principe de l'ISH avec amplification enzymatique.

On distingue sur la figure l'anticorps primaire (la streptavidine) et l'anticorps secondaire lié à l'enzyme phosphatase alcaline.

sondes présentant cinq fluorophores. Le caractère unique des ARNs détectés fut confirmé par des expériences de colocalisation multispectrale et de mesures d'intensité. La seconde expérience réalisée par Boulon, en 2002, démontre la possibilité de détecter des brins d'ARN hybridés sans amplification et de visualiser leur mouvement dans des cellules vivantes de la lignée HeLa [18]. Toutefois, ces deux expériences, bien qu'encourageantes pour la détection quantitative d'ARN, ont été réalisées en culture dans des cellules de grande taille et il reste de nombreuses difficultés à résoudre pour pouvoir l'appliquer à des organismes plus complexes.

### 8.3.3 Vers un FISH quantitatif

Au cours de ma thèse, dans le but de cartographier et de quantifier l'expression de gènes de mémoire, nous nous sommes penchés sur l'application de la technique de FISH sans amplification au cerveau des drosophiles adultes. Ceci est un défi de taille, le cerveau des drosophiles adultes étant un organisme pluricellulaire complexe dont les cellules sont de loin plus petites que celles des mammifères. En effet, jamais aucun protocole d'hybridation avec ou sans amplification n'a encore fourni de résultats reproductibles.

Le principe du FISH sans amplification, présenté à la figure 55, est nettement plus simple que celui du FISH-CARD puisqu'il fait uniquement appel à une ribosonde complémentaire de la séquence ARN d'intérêt. Cette ribosonde est marquée directement par des fluorophores.

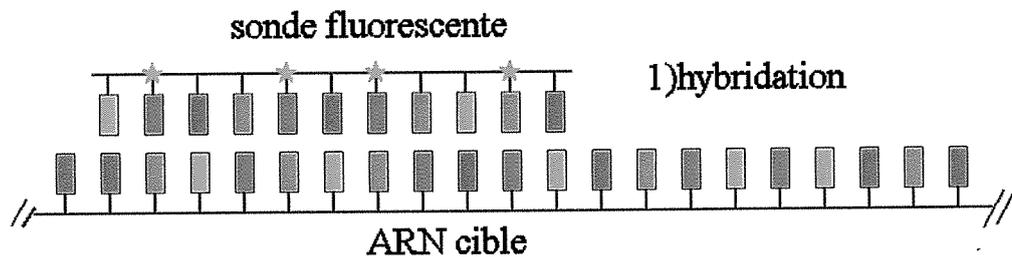


FIG. 55 – Principe de l'hybridation in situ sans amplification.

Ces derniers sont introduits, lors de la synthèse de la sonde, en remplaçant une partie des nucléotides par des nucléotides reliés à un fluorophore. Dans notre cas, nous utiliserons l'Uracile lié au Cy5.

L'absence de toute étape d'amplification présente l'avantage de limiter les sources de bruit. Hormis le marquage non spécifique et les fluctuations de l'efficacité l'hybridation, propres à tous les protocoles d'ISH, seuls subsistent le bruit de détection et l'autofluorescence. Cependant, les progrès des systèmes de détection et le développement de nouvelles sondes fluorescentes émettant sur des plages de longueur d'onde en dehors des zones d'autofluorescence peuvent nous permettre, moyennant un choix judicieux de la sonde et une optimisation du montage optique, de minimiser ces derniers. Toutefois, même si les sources de bruit lié à l'amplification sont écartées et que l'autofluorescence et le bruit de détection sont minimisés, le signal lié à l'hybridation non spécifique, et les fluctuations de l'efficacité d'hybridation doivent être sérieusement pris en compte. Il nous faudra donc également optimiser les paramètres d'hybridation, afin de pouvoir aboutir à un protocole de marquage spécifique et reproductible.

Ainsi, nous espérons dans un premier temps, obtenir un marquage FISH semi-quantitatif, spécifique et reproductible, afin de pouvoir évaluer spatialement et temporellement l'évolution d'expression de gènes de mémoire, de manière semi-quantitative. Le second objectif de notre expérience est de pouvoir compter les brins d'ARN, afin d'obtenir un outil quantitatif permettant de faire le lien entre l'échelle cellulaire et celle du réseau neuronal.

## 9 Mise en place et optimisation du dispositif expérimental

L'aboutissement de notre expérience, visant à détecter des sondes ARN uniques de faible brillance, dans un milieu complexe qu'est le cerveau de la drosophile, repose en partie sur le choix et l'optimisation du montage optique.

### 9.1 Choix initiaux : le montage et le fluorophore

La première étape de notre démarche expérimentale a consisté à prendre une décision concernant le type de système d'imagerie à mettre en oeuvre, les paramètres optiques de ce dernier et les fluorophores à utiliser.

#### 9.1.1 Choix du marqueur fluorescent et du système d'excitation

Comme déjà mentionné dans le second chapitre de ce manuscrit, l'autofluorescence peut être une source de bruit extrêmement préjudiciable. Elle est propre à l'espèce étudiée et, plus précisément, aux cellules visées. Ainsi, dans les yeux des drosophiles, on peut observer un signal d'autofluorescence sur la quasi-totalité du spectre visible. Pour limiter l'impact de l'autofluorescence et vérifier qu'elle n'interférera pas avec le signal de fluorescence de nos sondes, nous avons effectué une série d'expériences d'évaluation du niveau d'autofluorescence, à différentes longueurs d'onde et dans différentes zones d'intérêt. En procédant ainsi, nous avons été à même de choisir la longueur d'onde de travail et la sonde à utiliser afin de nous placer dans une configuration favorable.

Pour réaliser ce test, nous avons travaillé sur des individus appartenant à la lignée de drosophiles *GFP-Gal4* dont les particularités sont détaillées au paragraphe 10.4. Ces drosophiles expriment la GFP dans la région des corps pédonculés. Nous avons donc choisi deux zones (ROI, Region Of Interest) où tester l'autofluorescence, la première, ROI 1 (cf. Figure 56) dans les calices des corps pédonculés, où s'exprime la GFP, et la seconde, ROI 2, dans une zone du cerveau où la GFP n'est pas exprimée et donc où seule l'autofluorescence naturelle va contribuer. Dans ces deux zones, nous avons fait l'acquisition de la réponse spectrale entre 500 et 720nm pour l'excitation à 488nm, et entre 650 et 720nm pour l'excitation à

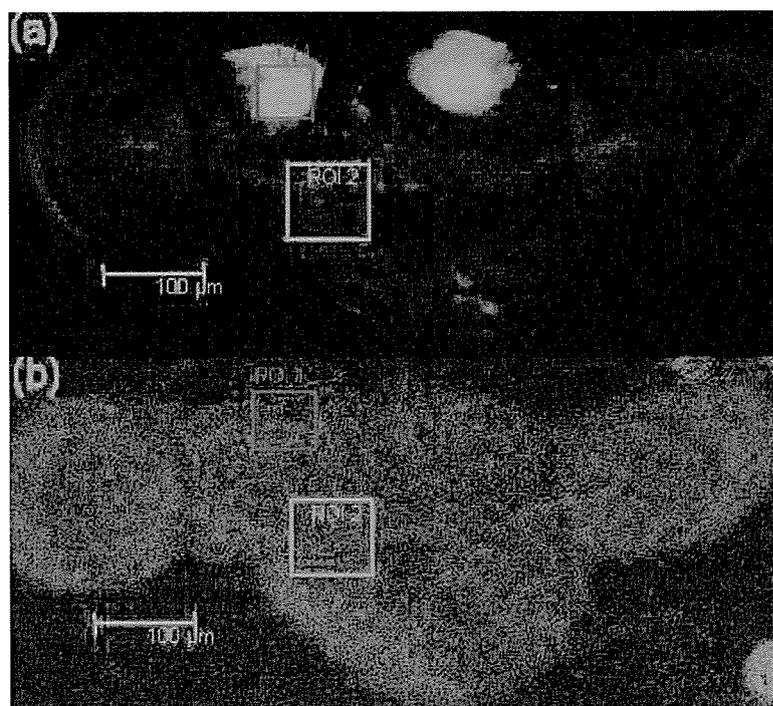


FIG. 56 – Évaluation du niveau d'autofluorescence.

Images confocales du cerveau d'une drosophile de souche *GFP-Gal4* (a) à  $\lambda = 488nm$ , (b) à  $\lambda = 633nm$ .

633nm, en corrigeant la sensibilité de détection du photomultiplicateur de sorte à obtenir une réponse linéaire indépendante de la longueur d'onde. Je présente sur la figure 57 les résultats obtenus avec les deux excitations et ce dans les deux zones d'intérêt. On constate, en se rapportant aux graphiques présentés sur la figure 57, que le niveau d'autofluorescence naturelle (ROI 1), pour une excitation à 488nm et une puissance de  $14\mu W$ , est nettement supérieure que pour une excitation à 633nm et une puissance de  $1,4mW$ , et ce quelle que soit la zone du cerveau considérée. On vérifie également que la contribution de la GFP (ROI 2) est extrêmement faible à 633nm, le signal étant donné par l'autofluorescence propre du tissu. Ainsi, ces d'études montrent que le rapport signal sur bruit pour un fluorophore dont la plage d'absorption se situe autour de 488nm, comme l'Alexa fluor 488 ou le calcium green (cf. Figure 58), sera beaucoup moins bon que pour un fluorophore excitable à 633nm comme le Cy5. Nous avons donc fait le choix de travailler avec une sonde excitable à 633nm, le Cy5, pour réaliser le marquage de nos ribosondes.

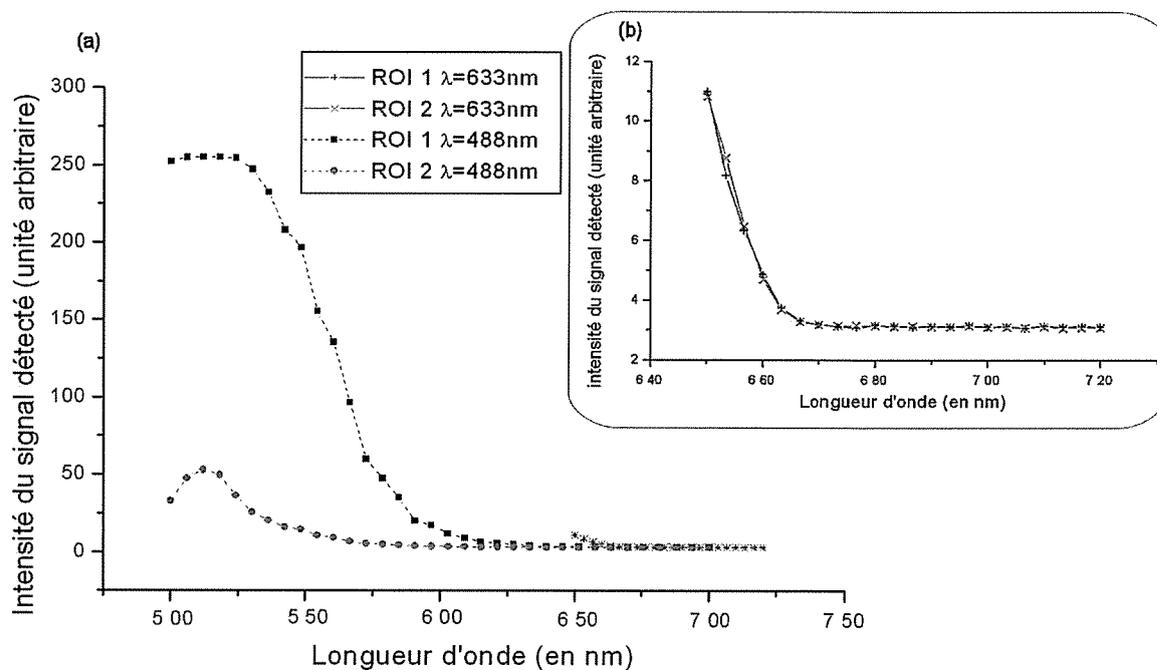


FIG. 57 – Études en longueur d'onde du niveau de signal d'autofluorescence.

La courbe (a) présente l'ensemble des résultats obtenus pour l'excitation à  $488\text{nm}$  et à  $633\text{nm}$  dans les deux zones définies par les ROIs présentées sur la figure 56. Le graphique (b) présente uniquement les résultats de l'expérience à  $633\text{nm}$  réalisée avec une puissance excitatrice maximale.

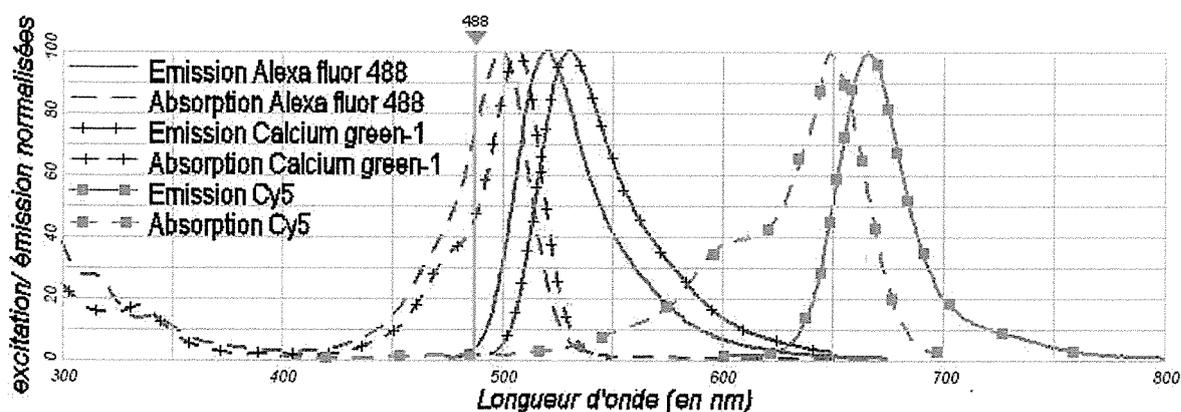


FIG. 58 – Spectres d'absorption et d'émission de l'Alexa fluor 488, du Calcium green1, et du Cy5.

### 9.1.2 Microscopie Confocale ou grand champ

Le premier choix auquel nous avons été confronté fut celui du type de microscopie à mettre en oeuvre afin d'imager les coupes cryogéniques de cerveaux de drosophiles. Les deux possibilités envisageables étaient, d'une part, la microscopie confocale et, d'autre part, la microscopie grand champ, chacune de ces techniques présentant, comme nous avons pu le voir au paragraphe 3 du chapitre 2, ses propres avantages et inconvénients.

La sensibilité constitue l'un des points clefs que notre système doit satisfaire. En effet, la détection de molécules uniques requiert une sensibilité élevée impliquant une détection efficace et optimisée. Le second point, qui fut déterminant dans notre prise de décision, fut la nécessité d'une acquisition rapide liée au grand nombre de coupes à observer afin de déterminer les zones du cerveau spécifiquement marquées et de pouvoir effectuer une étude statistique sur une population conséquente de spécimens.

Ainsi, au regard de ces deux critères, nous avons pris le parti de travailler avec un montage de microscopie grand champ. Comme je l'ai déjà souligné précédemment, un tel système présente, lorsqu'il est optimisé, une efficacité de détection (de l'ordre de 10 à 14%, pour l'objectif 40× à immersion, d'ouverture numérique 1,3) bien meilleure que celle à laquelle on peut s'attendre avec un microscope confocal (de l'ordre de 3%) et semble donc plus à même de nous fournir la sensibilité nécessaire à une détection à l'échelle de la molécule d'ARN unique. Par ailleurs, le signal émis par une sonde ARN unique est très faible, les sondes étant marquées avec une dizaine de fluorophores dont le rendement quantique de fluorescence,  $\phi_f$ , est de l'ordre de 0,15. De ce fait, la détection de ces ribosondes requiert un temps d'acquisition relativement long afin d'obtenir un contraste suffisant. Ainsi, le choix d'un montage grand champ, permet de diminuer très sensiblement le temps nécessaire à l'obtention d'une image de fluorescence, en comparaison avec le temps d'acquisition d'une image confocale réalisée point par point.

## 9.2 Le montage optique

Les bases de l'expérience posées, je me suis penchée sur des considérations plus techniques concernant le montage optique et ses constituants. Ces dernières, que je présenterai plus en détail au paragraphe suivant, nous ont menés au montage tel qu'il est présenté à la figure 59.

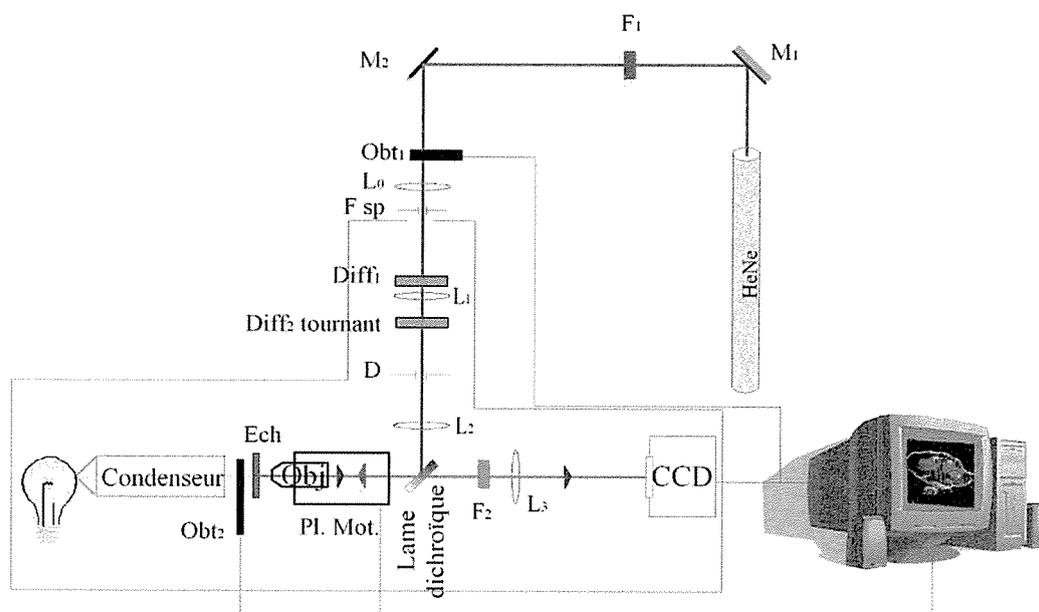


FIG. 59 – Schéma du microscope.

Les différents éléments constitutifs désignés par des sigles sont explicités ci-après : M=miroir, F=Filtre, Obt=Obturbateur, L=Lentille, Fsp= Filtrage spatial, Diff= Diffuseur, D=Diaphragme, Obj=Objectif, Ech=Echantillon, Pl. Mot=Platine Motorisée.

Le système d'imagerie est un montage de microscopie grand champ, équipé d'une série d'objectifs Nikon de grande ouverture numérique et de faible grossissement (CFI Plan Fluor DLL 10 $\times$ ,  $NA = 0,3$ ; CFI Plan Apochromat 20 $\times$ ,  $NA = 0,75$ ; CFI S Fluor 40 $\times$  huile,  $NA = 1,3$ ), placés sur une platine de translation motorisée dont la précision de positionnement est de 0,1 $\mu m$ .

L'excitation est constituée d'un laser Hélium Néon (HeNe) émettant à 633nm pour l'excitation des molécule de Cy5 et d'un filtre passe bande d'excitation centré à la longueur d'onde laser de notre précédente source, mais fonctionnant bien pour l'HeNe lorsqu'on lui applique une légère inclinaison ( $F_1$  centré à  $635 \pm 0,8nm$ , Omega 635NB4), d'un télescope de grandissement 23,4 $\times$  constitué de deux lentilles ( $L_0$ , un Obj 20 $\times$ ,  $EFL = 8,55mm$  et  $L_1$  de focale  $f_1 = 200mm$ ), d'un trou de filtrage employé à limiter l'entrée de lumière parasite dans la boîte noire contenant le reste des éléments du microscope, d'un système de deux diffuseurs, le premier fixe ( $Diff_1$ ), le second tournant à la vitesse de 2000 tours par minute ( $Diff_2$  tournant), destinés à homogénéiser l'éclairage, d'un diaphragme de champ (D), d'une lentille de focalisation ( $L_2$  de focale  $f_2 = 200mm$ ) et d'un miroir dichroïque (Semrock FF665-Di01) qui réfléchit et transmet respectivement sur les bandes spectrale 500 – 640nm et 660 – 825nm. L'imagerie anatomique des échantillons est réalisée grâce à un condenseur à lumière blanche (Nikon TE2000) nous permettant de faire l'acquisition d'images en contraste de phase (PHC).

La ligne de détection est constituée d'un nombre limité de composants dans le souci de minimiser au maximum les pertes et les sources potentielles d'aberrations. Elle se compose d'un l'objectif de microscope, du miroir dichroïque (Semrock FF665-Di01), d'un filtre de détection centré sur le maximum d'émission du Cy5 ( $F_2$ , Semrock FF01-692/40-25), d'une lentille de tube Nikon, composée de plusieurs optiques, élaborée spécialement pour fonctionner avec les objectifs du même constructeur et compenser leurs aberrations résiduelles. Enfin, la ligne de détection comporte une caméra CCD, initialement une caméra CCD Roper TEK 512 $\times$ 512 refroidie à l'azote liquide dont les pixels mesurent 24  $\times$  24 $\mu m$  et d'une efficacité quantique d'environ 80% sur la bande spectrale d'émission du Cy5, remplacée par la suite par un caméra refroidie Roper CoolSNAP<sub>HQ</sub> 1392 $\times$ 1040 dont les pixels mesurent 6,45  $\times$  6,45 $\mu m$  et qui présente une efficacité quantique d'environ 55% sur cette même bande spectrale.

### 9.3 Optimisation du montage

La détection semi-quantitative des sondes ne peut être envisagée sans une optimisation pointue d'un certain nombre de paramètres sur le montage optique. Les points sur lesquels nous avons porté nos efforts sont, d'une part, l'optimisation de l'homogénéité de l'éclairage inhérente à la microscopie grand champ, celui-ci devant être le plus uniforme possible afin de pouvoir comparer en toute rigueur les signaux de fluorescence provenant de différents points du champ de l'objectif et, d'autre part, la minimisation des aberrations du système afin d'améliorer au maximum sa résolution et également de pouvoir appliquer aux images acquises un algorithme de déconvolution et donc d'améliorer le rapport signal sur bruit.

#### 9.3.1 Homogénéisation de l'éclairage

Lorsque l'on souhaite comparer le niveau de signal en plusieurs points d'une même image afin, par exemple, d'évaluer de manière semi-quantitative le nombre de sondes dans différents types de cellules, l'importance d'un éclairage homogène sur la totalité du champ imagé apparaît clairement. Suivant la puissance et la qualité de l'éclairage que l'on souhaite obtenir, on peut faire appel à différentes techniques plus ou moins complexes, comme l'utilisation de système d'intégration [16], de microlentilles [44], de fibres optiques [68], d'optique diffractive [102][30], .... Dans notre cas, afin de disposer d'une puissance suffisante, répartie sur une bande spectrale étroite centrée sur la longueur d'onde d'absorption de la molécule de Cy5, nous avons opté pour un système d'éclairage laser impliquant une répartition d'énergie gaussienne et donc non uniforme. Le laser d'excitation délivrant une puissance de  $37mW$ , supérieure à nos besoins, nous avons décidé d'élargir de faisceau de sorte à ce que la partie utile pour l'illumination des échantillons corresponde au centre de la tache laser. Nous avons donc cherché à calculer le grandissement nécessaire afin qu'au bord de la zone illuminée la puissance corresponde au moins à 80% de l'intensité au centre de cette même zone.

La première étape a consisté à déterminer le diamètre souhaité de la tache laser "homogène"<sup>33</sup> sur le diaphragme de champ D, représenté sur la figure 59, de sorte que toute la surface de la CCD soit illuminée. Notre caméra dispose d'une matrice CCD de  $1392 \times 1040$  pixels carrés, de  $6,45\mu m$  de côté. La taille de la zone de l'échantillon imagée par la CCD est

<sup>33</sup>Nous désignerons par le terme tache laser "homogène" la zone de la tache laser pour laquelle l'écart de puissance entre centre et bord ne dépasse pas 20%.

fonction du grandissement de l'objectif utilisé, cependant les dimensions du faisceau d'excitation correspondant, en entrée de la lentille ( $L_2$ ), en sont indépendantes, puisque les focales des lentilles de focalisation sur la caméra ( $L_3$ ) et de focalisation du faisceau excitateur sur la pupille arrière de l'objectif ( $L_2$ ) sont identiques<sup>34</sup>. Ainsi, si on fait l'approximation d'un faisceau se propageant sans diverger entre la lentille  $L_2$  et le diaphragme de champ  $D$ , on peut conclure que la taille du faisceau sur cet élément doit être la même que celle de la CCD, soit, si on ne tient compte que de la grande dimension du capteur, de  $8992\mu m$ .

Afin d'obtenir un éclairage conforme à nos attentes, il est nécessaire qu'au niveau du diaphragme  $D$ , sur un disque de diamètre  $\phi_{80\%} = 8992\mu m$ , l'intensité de la tache laser entre le centre et le bord ne varie pas plus de 20%. Ainsi, on peut calculer le rayon  $r_{80\%} = \sqrt{2}w_{80\%}$  du faisceau laser à  $\frac{1}{e}$  du maximum d'intensité vérifiant l'égalité suivante :  $\exp\left(-\frac{2\left(\frac{\phi_{80\%}}{2}\right)^2}{w_{80\%}^2}\right) = 0,8$ ,  $r_{80\%} = \sqrt{2}w_{80\%} = 19,04mm$ .

Dans un second temps, j'ai cherché à déterminer le grandissement du télescope nous permettant d'obtenir un faisceau laser vérifiant  $r_{80\%} = 19,04mm$  sur le diaphragme  $D$ . Pour ce faire, j'ai, tout d'abord, mesuré par focaultage, en sortie de laser, le diamètre  $2r_{1/e}$  du faisceau à  $\frac{1}{e}$  du maximum d'intensité (cf. Annexe 3 : Foucaultage) comme étant égale à  $r_{1/e} = 496 \pm 1,6\mu m$ . Puis, en s'appuyant sur le formalisme de propagation des faisceaux gaussiens, j'ai calculé le grandissement du télescope tel qu'en sortie de ce dernier, les dimensions du faisceau vérifient les critères de tailles déterminés lors de la première étape décrite ci-dessus. Ces calculs m'ont amenée à la conclusion suivante (le détails des calculs est présenté dans l'Annexe 4- Évolution de la taille d'un faisceau gaussien à travers la ligne d'excitation) : le télescope doit avoir un grandissement de l'ordre de  $23,4\times$  afin que le rayon du faisceau, sur le diaphragme  $D$ ,  $r'_{1/e}$ , vérifie  $r_{80\%} \leq r'_{1/e} = 19,8mm$ . Ainsi, en utilisant un télescope constitué d'une lentille  $L_1$  de focale effective  $8,55mm$  et d'une lentille  $L_2$  de focale  $200mm$ , on doit obtenir le bon grandissement pour satisfaire le critère d'un éclairage homogène.

Afin de vérifier les conclusions théoriques précédentes, j'ai procédé à une série d'expériences consistant à imager le faisceau d'éclairage au niveau du diaphragme de champ (qui lui même est ensuite imagé sur l'échantillon). J'ai donc comparé les résultats obtenus pour deux télescopes de grandissements différents. Le premier testé est un télescope constitué d'un

<sup>34</sup>Les focales de ces deux lentilles sont égale à  $200mm$  ce qui correspond à la distance focale pour laquelle le grandissement des objectifs Nikon est conforme à celui fourni par le constructeur.

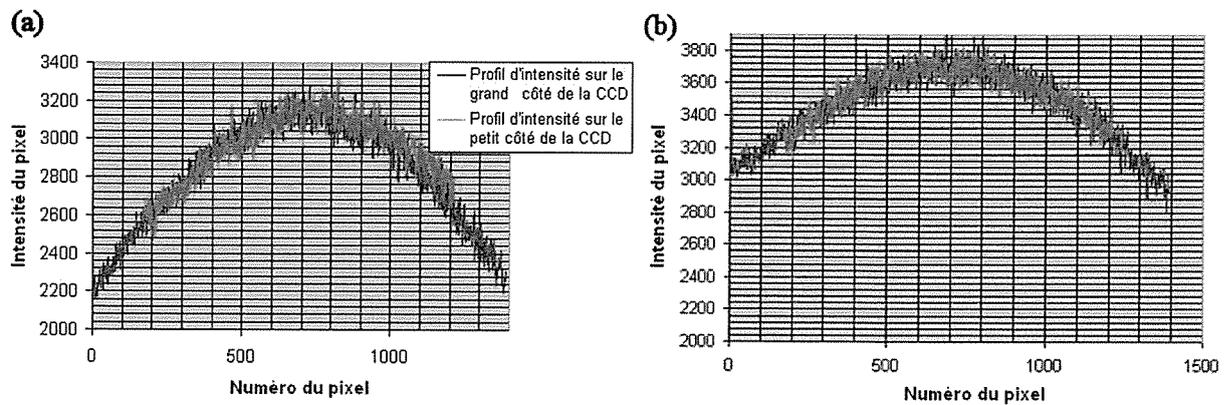


FIG. 60 – Répartition de l'intensité d'excitation sur la CCD.

Le graphique (a) correspond au résultat obtenu avec un télescope de grandissement de  $17,5\times$ , et le (b) avec un télescope de grandissement de  $23,4\times$ .

objectif de focale équivalente  $8,55\text{mm}$  et d'une lentille de focale  $150\text{mm}$  présentant donc un grandissement d'environ  $17,5\times$ . Le second télescope testé est constitué d'un objectif de focale équivalente  $8,55\text{mm}$  et d'une lentille de focale  $200\text{mm}$  ce qui lui confère un grandissement d'environ  $23,4\times$ . Pour ces deux systèmes, j'ai mesuré les profils d'intensité sur la longueur (grand côté) et la largeur (petit côté) de la CCD (cf. Figure 60). J'ai ensuite déterminé le pourcentage de l'intensité centrale mesuré en bord de CCD, en prenant comme intensité maximal la moyenne des quarante pixels au centre de la CCD et comme minimum la moyenne des dix pixels pris au bord de la CCD (cinq pixels de chaque côté). En se reportant à la figure 60 qui présente les profils d'illumination et aux résultats consignés dans les tableaux 4.1 et 4.2, on constate bien l'amélioration de l'homogénéité apportée par l'utilisation d'un télescope de plus fort grandissement, confortant ainsi les résultats prédits par la théorie.

	Grand côté	Petit côté
Moyenne des 40 pixels au centre de la CCD (max moyen)	3038	3053
Moyenne des 10 pixels au bord de la CCD (min moyen)	2187	2600
Rapport max sur min (en % du max moyen)	72 %	85,2 %

Tableau 4.1 : Étude de l'homogénéité de l'éclairage pour un grandissement  $17,5\times$

	Grand côté	Petit côté
Moyenne des 40 pixels au centre de la CCD (max moyen)	3608	3624
Moyenne des 10 pixels au bord de la CCD (min moyen)	2943	3238
Rapport max sur min (en % du max moyen)	81,6 %	89,4 %

**Tableau 4.2** : Étude de l'homogénéité de l'éclairage pour un grandissement  $23,4\times$

En effet, avec le plus faible grandissement on ne parvient pas à atteindre notre objectif. La chute d'intensité en bord de CCD, lorsque l'on s'intéresse au grand côté, dépasse les 20% du maximum, lorsque l'on effectue l'expérience avec un grandissement de  $17,5\times$ . Par contre, en travaillant avec un grandissement de  $23,4\times$ , conformément aux résultats du calcul théorique, on parvient à satisfaire notre critère d'éclairage homogène

### 9.3.2 Suppression du speckle

Le phénomène de speckle traduit les variations aléatoires d'intensité produites par les interférences mutuelles des fronts d'ondes cohérents ayant subi des déphasages au cours de leurs trajets. Ce phénomène apparaît lorsqu'un faisceau de lumière cohérente traverse ou est reflété par une surface rugueuse. L'image formée avec un tel éclairage pouvant également être produite par des optiques imparfaites ou par les inhomogénéités de l'atmosphère (très influantes en radar ou en astrophysique) présente un aspect rugueux qui dégrade sa qualité, fait diminuer le contraste et la résolution. L'intensité en chaque point de l'image résulte de la superposition des contributions des différents fronts d'ondes présentant une phase aléatoire en raison des différences de longueur de chemin optique. De nombreuses études [75][52][170][5] ont montrées que, lorsque l'on travaille en éclairage cohérent comme c'est notre cas, un tel phénomène, agit comme la superposition d'un bruit, type bruit de grenaille, sur l'image obtenue, et dégrade la résolution spatiale (les hautes fréquences spatiales contenues dans l'image sont masquées par la structure du speckle). Il doit donc être éliminé lorsque l'on souhaite optimiser un système de microscopie.

Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur l'ouvrage de J. W. Goodman [54] et sur les travaux de Lowenthal et Joyeux [83] qui proposent d'utiliser un système de deux diffuseurs l'un fixe et l'autre tournant afin de détruire la cohérence spatiale du faisceau laser et ainsi

de faire diminuer au maximum le contraste du speckle. Pour comprendre l'efficacité d'un tel système, nous allons tout d'abord considérer le cas d'un unique diffuseur tournant.

Lorsqu'un objet est éclairé par un diffuseur tournant, chaque point de l'image est le fruit des contributions des différentes phases aléatoires, changeant au cours du temps du fait du mouvement insufflé au diffuseur. Ceci revient donc, pour des grains de speckle situés sur un même cercle, à moyenniser le signal pendant le temps d'intégration (temps d'acquisition d'une image), sur un certain nombre de figures de speckle indépendantes. Toutefois, le temps d'intégration n'étant pas infini, l'effet de moyenne produit par un unique diffuseur tournant n'est généralement pas suffisant pour détruire la cohérence spatiale. Nous allons donc modéliser le système constitués d'un seul diffuseur tournant pour justifier ceci et expliquerons ensuite l'intérêt d'ajouter au système un second diffuseur fixe.

Pour simplifier les calculs nous utiliserons la théorie scalaire.

Pour commencer, nous allons exprimer le champ,  $A(x, y; t)$ , à un instant  $t$ , en un point de coordonnées  $(x, y)$  du plan image du système, composé d'un éclairage ayant traversé un diffuseur mince de transmittance aléatoire décrite par la fonction  $a(x, y; t)$ , et d'un système d'imagerie représenté par la fonction  $h(x, y)$  qui décrit l'amplitude de sa réponse impulsionnelle ou PSF :

$$A(x, y; t) = \iint_{-\infty}^{+\infty} a(\alpha, \beta; t) h(x + \alpha, y + \beta) d\alpha d\beta \quad (4.1(a))$$

On notera la présence du signe + dans les arguments de  $h(x + \alpha, y + \beta)$ , là où classiquement l'autocorrélation se traduit par un signe -. Ce changement a été fait afin de tenir compte de l'inversion de l'image par le système optique.

En supposant un unique diffuseur tournant de transmittance uniforme, on peut écrire  $a(\alpha, \beta; t)$  sous la forme :

$$a(\alpha, \beta; t) = a_0 e^{j\phi_d(\alpha - vt, \beta)} \quad (4.1(b))$$

Avec  $a_0$  un terme d'amplitude constant,  $v$  la vitesse linéaire constante du diffuseur tournant et  $\phi_d(r)$  la fonction différence de phase introduite par le diffuseur.

Afin de quantifier l'impact du diffuseur tournant sur le contraste du speckle  $C$ , on définit le rapport signal sur bruit RMS<sup>35</sup> (Root mean Square),  $(\frac{S}{B})_{rms}$ , égal au rapport entre la

<sup>35</sup>Le rapport signal sur bruit RMS correspond à l'écart moyen entre la répartition d'intensité totale et la répartition d'intensité correspondant au signal utile.

moyenne de l'intensité mesurée,  $\bar{I}$ , et la variance de cette intensité,  $\sigma_I$  :

$$\left(\frac{S}{B}\right)_{rms} = \frac{\bar{I}}{\sigma_I} = \frac{1}{C} \quad (4.2)$$

Afin de pouvoir quantifier la dépendance du speckle vis-à-vis de la rotation du diffuseur, nous allons chercher à exprimer l'autocovariance,  $C_A(\tau)$ , du champ  $A(x, y; t)$ . Et, pour y parvenir, commençons par écrire l'autocorrélation temporelle du champ  $\Gamma_A(\tau)$ , dans le plan image :

$$\begin{aligned} \Gamma_A(\tau) &= \overline{A(0, 0; t)A^*(x, y; t)} \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} h(\alpha_1, \beta_1)h^*(\alpha_2, \beta_2) \times \overline{a(\alpha_1, \beta_1; t)a^*(\alpha_2, \beta_2; t - \tau)} d\alpha_1 d\beta_1 d\alpha_2 d\beta_2 \end{aligned} \quad (4.3)$$

Si on considère d'un processus de phase gaussien stationnaire et de moyenne nulle, le terme de moyenne dans l'intégrale peut être exprimé comme suit :

$$\overline{a(\alpha_1, \beta_1; t)a^*(\alpha_2, \beta_2; t - \tau)} = |a_0|^2 e^{j[\phi_d(\alpha_1 - vt, \beta_1) - \phi_d(\alpha_2 - vt + v\tau, \beta_2)]} = |a_0|^2 e^{-\sigma_d^2[1 - \mu_d(\Delta\alpha - v\tau, \Delta\beta)]} \quad (4.4)$$

Avec  $\sigma_d^2$  et  $\mu_d$  respectivement la variance et l'autocorrélation normalisée de  $\phi_d$ , et  $\Delta\alpha = \alpha_1 - \alpha_2$ ,  $\Delta\beta = \beta_1 - \beta_2$ .

Dans ces conditions, on peut réécrire la fonction d'autocorrélation sous la forme suivante :

$$\Gamma_A(\tau) = |a_0|^2 \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} H(\Delta\alpha, \Delta\beta) e^{-\sigma_d^2[1 - \mu_d(\Delta\alpha - v\tau, \Delta\beta)]} d\Delta\alpha d\Delta\beta \quad (4.5)$$

Où  $H(\Delta\alpha, \Delta\beta)$  est la fonction d'autocorrélation de l'amplitude de la PSF du système optique :

$$H(\Delta\alpha, \Delta\beta) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} h(\alpha_1, \beta_1)h^*(\alpha_1 - \Delta\alpha, \beta_1 - \Delta\beta) d\alpha_1 d\beta_1 \quad (4.6)$$

On en déduit alors l'autocovariance du champ dans le plan image :

$$C_A(\tau) = \Gamma_A(\tau) - \overline{AA^*} = |a_0|^2 e^{-\sigma_d^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} H(\Delta\alpha, \Delta\beta) \left[ e^{\sigma_d^2 \mu_d(\Delta\alpha - v\tau, \Delta\beta)} - 1 \right] d\Delta\alpha d\Delta\beta \quad (4.7)$$

Dans cette expression, le premier terme traduit l'effet du système optique et le second celui du diffuseur tournant.

La forme de la fonction  $H$ , autocorrélation de la PSF du système, n'est rien d'autre que la transformée de Fourier du carré de la fonction de transfert spectral. Ainsi, pour une pupille circulaire de diamètre  $D$ , de transmittance uniforme, que nous prendrons égale à un à l'intérieur de la pupille et zéro à l'extérieur, se situant à une distance  $z$  du plan image, on peut écrire  $H(\Delta\alpha, \Delta\beta)$  comme suit :

$$H(\Delta\alpha, \Delta\beta) \propto 2 \frac{J_1\left(\frac{\pi D r}{\lambda z}\right)}{\frac{\pi D r}{\lambda z}} \quad (4.8)$$

où  $J_1$  est la fonction de Bessel d'ordre 1 et  $r = \sqrt{\Delta\alpha^2 + \Delta\beta^2}$ .

En considérant toujours la fonction d'autocorrélation normalisée du processus de phase,  $\mu_d$ , comme gaussienne, on peut l'exprimer sous la forme :

$$\mu_d(\Delta\alpha, \Delta\beta) = e^{-\frac{\Delta\alpha^2 + \Delta\beta^2}{r_d^2}} \quad (4.9)$$

L'équation 4.7 devient alors :

$$C_A(\tau) = |a_0|^2 e^{-\sigma_d^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} H(\Delta\alpha, \Delta\beta) \left[ \exp\left(\sigma_d^2 e^{-\frac{(\Delta\alpha - v\tau)^2 + \Delta\beta^2}{r_d^2}}\right) - 1 \right] d\Delta\alpha d\Delta\beta \quad (4.10)$$

Et la fonction d'autocovariance normalisée s'écrit :

$$\mu_A(\tau) = \frac{C_A(\tau)}{C_A(0)} = \frac{\iint_{-\infty}^{+\infty} H(\Delta\alpha, \Delta\beta) \left[ \exp\left(\sigma_d^2 e^{-\frac{(\Delta\alpha - v\tau)^2 + \Delta\beta^2}{r_d^2}}\right) - 1 \right] d\Delta\alpha d\Delta\beta}{\iint_{-\infty}^{+\infty} H(\Delta\alpha, \Delta\beta) \left[ \exp\left(\sigma_d^2 e^{-\frac{\Delta\alpha^2 + \Delta\beta^2}{r_d^2}}\right) - 1 \right] d\Delta\alpha d\Delta\beta} \quad (4.11)$$

Pour une pupille circulaire, la largeur de la fonction d'autocorrélation de la PSF  $H(\Delta\alpha, \Delta\beta)$  est approximativement égale à  $\frac{\lambda z}{D}$ , et l'autocorrélation du diffuseur tournant,  $\mu_d(\Delta\alpha, \Delta\beta)$ , présente une largeur de l'ordre de deux fois le rayon de cohérence des grains du diffuseur dans la direction  $\Delta\alpha$ , généralement beaucoup plus petite que celle de  $H(\Delta\alpha, \Delta\beta)$ . Ainsi on

peut approximer l'expression 4.11 par :

$$\mu_A(\tau) \approx \frac{H(v\tau, 0)}{H(0, 0)} = 2 \frac{J_1\left(\frac{\pi D v \tau}{\lambda z}\right)}{\frac{\pi D v \tau}{\lambda z}} \quad (4.12)$$

Le temps de corrélation de l'intensité du speckle, au bout duquel on obtient une figure de speckle indépendante de la précédente, s'écrit alors :

$$\tau_C = \int_{-\infty}^{+\infty} |\mu_A(\tau)|^2 d\tau = \frac{8\lambda z}{3\pi^2 v D} \quad (4.13)$$

Afin de tenir compte de l'intégration temporelle du speckle sur le temps d'acquisition et d'en déduire le rapport signal sur bruit, on introduit le paramètre  $M$  qui traduit le nombre de degrés de liberté, tel que :

$$M = \frac{\left[ \int_{-\infty}^{+\infty} P_T(\tau) d\tau \right]^2}{\int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} P_T(t) P_T(t - \tau) |\mu_A(\tau)|^2 dt d\tau} \quad (4.14)$$

Où  $P_T(t)$  représente la fenêtre d'intégration temporelle.

Dans notre cas  $M$  s'écrit :

$$M = \left[ 2 \int_0^1 (x-1) \frac{J_1^2\left(\frac{\pi D v T}{\lambda z} x\right)}{\left(\frac{\pi D v T}{\lambda z} x\right)^2} dx \right]^{-1} \quad (4.15)$$

Et peut être approximé par :

$$M \approx \left[ \frac{1}{T} \int_{-\infty}^{+\infty} |\mu_A(\tau)|^2 d\tau \right]^{-1} = \frac{T}{\tau_C} \quad (4.16)$$

On en déduit le contraste du speckle dans le plan image, diminuant comme la racine carrée de l'inverse du nombre de figures de speckle indépendantes :

$$C = \sqrt{\frac{1}{M}} \approx \sqrt{\frac{\lambda z}{D v T}} \quad (4.17)$$

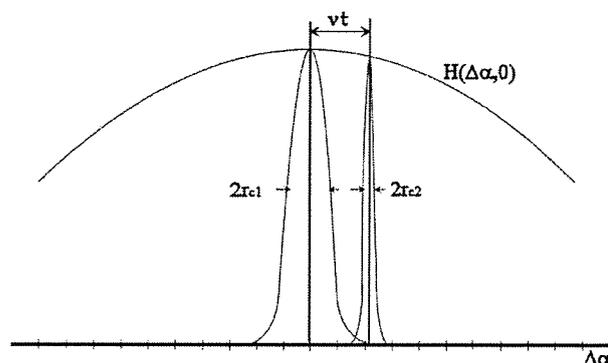


FIG. 61 – Illustration des paramètres déterminant l'autocovariance du speckle et donc son contraste. Les paramètres  $r_{c1}$  et  $r_{c2}$  représentent respectivement les rayons de cohérence des grains de speckle du diffuseur fixe et du diffuseur tournant. Dans le cas d'un unique diffuseur tournant,  $r_{c1}$  n'a pas lieu d'être et l'obtention de deux figures de speckle indépendantes nécessite une rotation du diffuseur d'une distance  $vt$  supérieure à la largeur de la fonction d'autocorrélation de la PSF,  $H(\Delta\alpha, 0)$ . Dans le cas de deux diffuseurs, l'un tournant l'autre fixe, il suffira de faire tourner le diffuseur d'une distance  $vt$  supérieure à  $r_{c1} + r_{c2}$  pour obtenir une figure de speckle indépendante de celle considérée initialement.

On constate donc que, dans le cas d'un unique diffuseur tournant, la cohérence du speckle et donc le rapport signal sur bruit vont dépendre de deux facteurs (cf. Figure 61) : d'une part, de la vitesse de rotation du diffuseur  $vT$  et d'autre part, du système optique  $\frac{\lambda z}{D} \approx \lambda/NA$  où  $NA$  est l'ouverture numérique du système. En effet, avant le système optique, le nombre de figures de speckle indépendantes va dépendre aussi bien de la distance parcourue par le diffuseur, que de la taille des grains de speckle indépendants. Cependant, la résolution du système optique étant inférieure à celle des grains de speckle, la formation d'un point de l'image va résulter de la contribution de plusieurs grains séparés d'une distance inférieure à la résolution du système. Pour cette raison, le nombre de figures de speckle indépendantes superposées pendant le temps d'acquisition va correspondre au rapport entre la résolution du système et la distance parcourue par le diffuseur (cf. Figure 61). Ainsi, pour annuler la cohérence du speckle, même pour un système optique de grande ouverture numérique et une vitesse de rotation élevée il faudrait intégrer sur un temps infini.

Afin d'améliorer encore la qualité de l'éclairage, on introduit donc à un second diffuseur fixe, avant le diffuseur tournant, dans le système optique.

Le rapport signal sur bruit dépend dès lors du rayon de corrélation,  $r_c$ , entre les cellules

élémentaires des deux diffuseurs, plus critique que la résolution du système optique,  $r_c \ll \frac{\lambda z}{D}$ , comme c'est le cas dans le système à un diffuseur (cf. Figure 61). En effet, dès que le diffuseur tourne d'une distance supérieure à la distance de cohérence entre les grains de speckle des deux diffuseurs, on obtient une nouvelle figure de speckle indépendante de la précédente, et ce, sans que la résolution du système optique n'intervienne. Ainsi, le nombre de diffuseurs effectifs indépendants est beaucoup plus grand que dans le cas d'un unique diffuseur tournant. Dans ce cas, la cohérence du speckle dépend du déplacement du diffuseur et du rayon de corrélation entre les grains de speckle des deux diffuseurs. De ce fait, pour une même vitesse de rotation et un temps d'acquisition donné, la baisse de cohérence du speckle sera beaucoup plus significative dans le cas à deux diffuseurs.

Toutefois, on doit noter que l'ajout d'un second diffuseur engendre une diminution de l'intensité collectée par le système optique, il est donc important de tenir compte de ce point lorsque la puissance excitatrice disponible est limitée.

Disposant de suffisamment de puissance, il apparaît clairement que dans notre cas, on aura tout intérêt à choisir la configuration à deux diffuseurs afin supprimer au maximum le speckle. Par ailleurs, on notera qu'il a été montré [25] que la distance séparant les deux diffuseurs, pour une vitesse et un système optique donnés, joue un rôle sur la chute du contraste du speckle, à savoir que plus la distance entre les diffuseurs est grande moins le speckle résiduel sera contrasté. On comprend ceci en soulignant qu'en éloignant les deux diffuseurs l'un de l'autre on fait chuter le rayon de cohérence.

Nous avons pu vérifier expérimentalement l'apport de ce système sur notre montage, comme le montre la figure 62. On constate, à première vue, que, sans filtre ni diffuseur, l'image (a) est inexploitable. Lorsque l'on ajoute un (b), puis deux diffuseurs fixes (c), toujours en imageant sans aucun filtre de détection, la seule structure visible sur l'image correspond aux grains de speckle dont la taille diminue quand on ajoute le second diffuseur. Par contre, en travaillant avec un unique diffuseur tournant (d), la qualité de l'image est améliorée du fait de la moyenne sur les grains de speckle liée à la rotation. Toutefois, le temps d'acquisition de 0,4 seconde et la vitesse de rotation de 2000 tours/min ne semble pas suffisants, la structure du speckle persiste et se traduit par les anneaux concentriques que l'on observe sur la figure (d). On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ceci : la durée finie de l'acquisition, mais également, la transparence potentiellement non uniforme de notre diffuseur et la taille

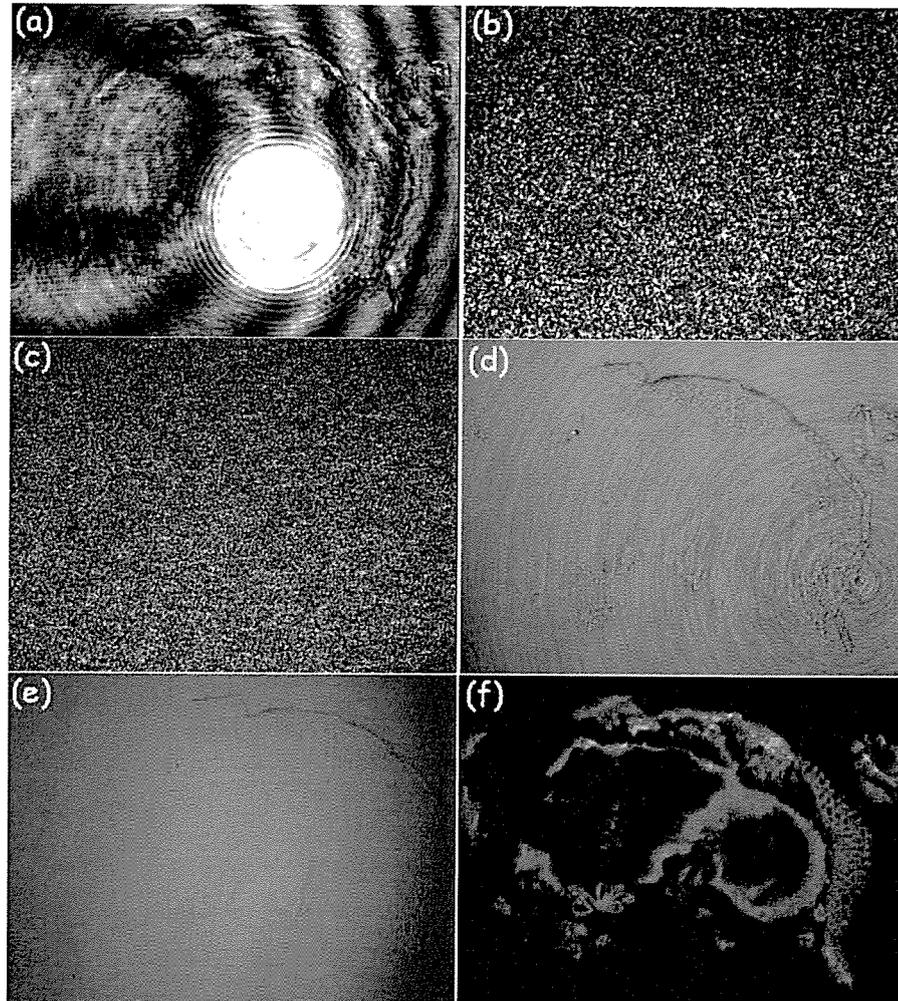


FIG. 62 – Correction du speckle.

Les images ont toutes été acquises avec l'objectif  $10\times$ ,  $NA = 0,3$  et un temps d'exposition d'une seconde. Les images (a), (b) et (c), acquises sans filtre de détection, correspondent respectivement aux résultats obtenus sans diffuseur, avec uniquement un diffuseur fixe et avec les deux diffuseur fixes. Les images (d) et (e) prises également sans filtre de détection présentent les résultats obtenus avec uniquement un diffuseur tournant à 2000 tours/min (d) et avec un diffuseur fixe et un diffuseur tournant à 2000 tours/min (e). La dernière image (f) correspond au cas de l'image (e) mais avec un filtre de détection Omega centré sur l'émission du Cy5.

des grains de speckle des diffuseurs holographiques, que nous avons choisis pour leur faible angle de diffusion, supérieure à celle d'un diffuseur classique. Enfin, lorsque l'on ajoute un diffuseur fixe devant le diffuseur tournant, comme le prédit la théorie, l'effet du speckle est pratiquement éliminé (e). Je présente également le résultat obtenu après ajout d'un filtre de

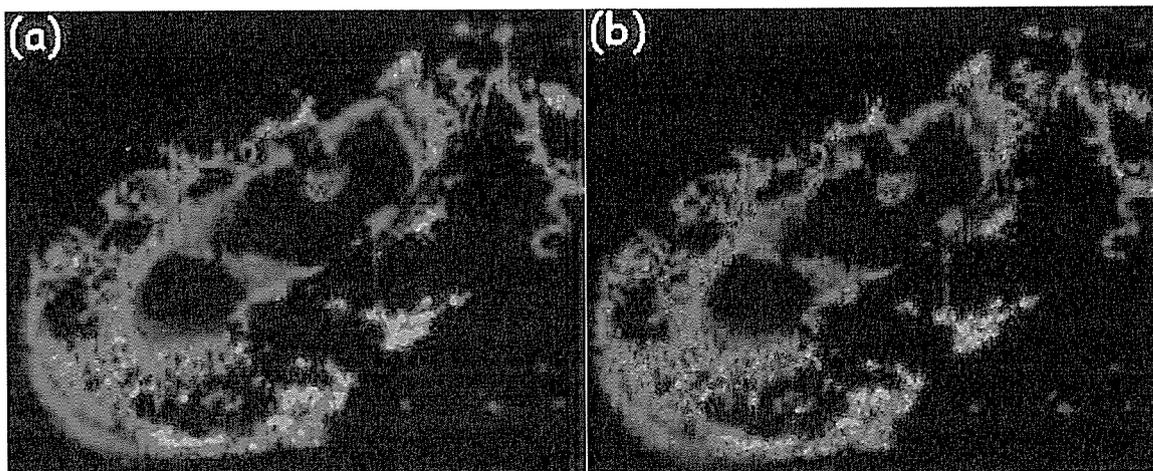


FIG. 63 – Comparaison de la qualité d'image avec deux diffuseurs fixes ou un fixe et un tournant. (a) image (obj 10 $\times$ ,  $NA = 0,3$ , 1 sec) réalisée avec un diffuseur fixe et un tournant. (b) image réalisée dans les mêmes conditions mais avec deux diffuseurs fixes.

détection (f) dans les mêmes conditions que (e). On ne distingue plus aucun grain de speckle sur cette image. La figure 63 permet d'observer l'impact du speckle même lorsque l'on filtre les longueurs d'onde parasites sur la ligne de détection. En effet, on est à même d'observer les grains de speckle sur l'image (b) où le diffuseur 2 ne tourne pas, ce qui n'apparaît plus sur l'image (a) quand ce diffuseur tourne.

Il apparaît donc clairement que notre système de diffuseurs permet de supprimer le speckle et d'améliorer la qualité de l'éclairage.

### 9.3.3 Correction des aberrations

Comme nous avons pu le voir au cours du chapitre précédent, les aberrations<sup>36</sup> sont des sources connues de nombreux problèmes en microscopie. Dans le cas d'un montage destiné

<sup>36</sup>Pour plus d'informations sur les différentes aberrations optiques et leurs conséquences, j'invite le lecteur à se reporter aux cours de microscopie proposés par Nikon (<http://www.microscopyu.com/>) et Olympus (<http://www.olympusmicro.com/>) qui mettent une bonne introduction à disposition des internautes.

à l'imagerie de fluorescence quantitative ou à l'imagerie 3D, qui requiert l'invariance dans l'espace et dans le temps de la réponse impulsionnelle de l'appareil, celles-ci sont d'autant plus critiques et doivent donc être évaluées puis corrigées du mieux qu'il se peut. En utilisant des objectifs plans apochromatiques et fluorite, les images obtenues sont en majeure partie exemptes de toute aberration chromatique<sup>37</sup> et devraient (sauf pour le fluorite), dans un système idéal, être bien corrigées de la courbure de champ, de l'astigmatisme, et de la coma. Toutefois, ces aberrations sont extrêmement sensibles aux défauts d'alignement (centrage, tilts, même minimes) et aux différents éléments optiques choisis. En effet, en couplant un objectif et une lentille de tube de marque différente, les propriétés de l'objectif, sensé être corrigé pour un certain nombre d'aberrations, ne sont plus garanties. C'est en réalité le couple lentille de tube objectif qui est corrigé. Ainsi, un soin particulier doit être consacré au choix des différents éléments et surtout à leur alignement.

La dernière aberration à laquelle il est primordial de s'intéresser est l'aberration sphérique. L'impact de cette aberration [76] [140] [156] [139] et les moyens de la corriger [17] [159] ont été largement étudiés, car, malgré les efforts des fabricants d'objectifs, elle reste un paramètre préjudiciable dans de nombreuses applications. En effet, l'adaptation de l'indice de réfraction des spécimens avec celui prévu par le constructeur, la profondeur des objets étudiés dans les échantillons, ainsi que les épaisseurs de verre traversées constituent chacune une source d'aberration sphérique qui va influencer sur les performances (résolutions axiale et latérale) du système d'imagerie.

On notera que la distorsion est généralement présente dans les systèmes d'imagerie, mais reste inférieur à un pour-cent, ce qui est suffisamment faible pour que l'on puisse négliger son impact sur la qualité des images obtenues.

Afin de limiter au maximum les pertes de signal et les sources de désalignement et donc d'aberration, nous avons simplifié au maximum (un objectif, un miroir dichroïque, un filtre, une lentille de focalisation, une caméra CCD) la ligne de détection de notre microscope (cf. Figure 59) et avons attaché un soin particulier à l'alignement du montage et au choix de la lentille de tube, de sorte qu'elle maximise les performances des objectifs. Pour détecter les éventuelles aberrations du système, les identifier et évaluer leur ampleur, nous avons fait

---

<sup>37</sup>Correction valables pour le spectre visible : superposition du bleu, du vert et du rouge pour les objectifs fluorite et également du bleu lointain pour les objectifs plan Apochromat (cf. <http://www.olympusmicro.com/primer/microscopy.pdf>)

l'acquisition de la réponse impulsionnelle, ou fonction d'appareil (PSF) de notre microscope avec les différents objectifs utilisés, et en plusieurs points du champ (certaines aberrations comme l'astigmatisme ou la coma étant des aberrations dites hors d'axes, absentes sur l'axe optique). L'acquisition de la PSF du système peut être réalisée expérimentalement en imageant des objets tels que des billes fluorescentes de dimensions inférieures à la résolution du système, de telle sorte que l'on puisse les considérer comme des objets ponctuels. En s'appuyant sur des travaux déjà existants [60] [169] dans le domaine, on choisira des billes dont le rayon est compris entre  $r_{xy}$  et  $1/3r_{xy}$  où  $r_{xy}$  est la résolution latérale (cf. eq. 2.27) du système optique, afin d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant. Nous avons pris le parti de suivre la règle conseillant le choix d'un rayon égal  $1/3r_{xy}$  [35], soit pour un objectif d'ouverture numérique 1,3 (avec lequel nous avons travaillé), dont la résolution latérale  $r_{xy}$  à  $633nm$  est évaluée à  $0,297\mu m$ , nous avons choisi des billes de diamètre  $0,2\mu m$  (FluoSpheres carboxylate-modified microspheres, crimson fluorescent 625/645 de chez Invitrogen). Ces billes ont été diluées dans l'éthanol ou dans l'eau ( $c/500000$ ), déposées sur une lamelle et séchées à  $40^{\circ}C$  jusqu'à évaporation du liquide. J'ai ensuite déposé une goutte ( $\simeq 7\mu L$ ) de milieu d'immersion (Dakocytomation Fluorescent Mounting medium) sur cette lamelle que j'ai ensuite scellée sur une lame de microscope avec du vernis à ongle non fluorescent [129].

L'écart à l'indice de réfraction prévu par le constructeur étant un facteur influençant grandement la quantité d'aberrations, en particulier sphérique [35][53], nous avons choisi un milieu d'immersion d'indice de réfraction adapté ( $n = 1,5$ ) pour travailler avec un objectif à immersion à huile. Récemment, nous avons, dans le cas des échantillons biologiques, appliqué un protocole permettant de remplacer l'eau ( $n = 1,33$ ) contenue dans les cellules par un milieu de montage le 2,20-Thiodiethanol (TDE) d'indice  $n = 1,515$  [144] plus proche de celui de l'huile ( $1,515$  à  $23^{\circ}C$ ) et des lamelles (lamelles BK7  $1,515$  à  $20^{\circ}C$  et  $\lambda = 633nm$ ).

Les acquisitions de PSF ont été réalisées grâce à un logiciel d'acquisition développé par Alain Richard spécialement pour l'expérience. Ces acquisitions ont consisté à acquérir des piles d'images de billes fluorescentes, à différentes profondeurs de focalisation et en différents points du champ. Le pas de séquençage,  $\Delta z$ , des échantillons a été préalablement calculé afin de satisfaire le critère d'échantillonnage de Nyquist-Shannon<sup>38</sup> qui, dans notre cas, peut

<sup>38</sup>Le théorème de Nyquist-Shannon peut être énoncé comme suit : la fréquence d'échantillonnage d'un signal doit être égale ou supérieure au double de la fréquence maximale contenue dans ce signal, afin de convertir ce signal d'une forme analogique à une forme numérique.

s'écrire :

$$\Delta z \leq \frac{r_z}{2} \quad (4.18)$$

Où  $r_z$  est la résolution axiale du système optique, telle que pour un objectif d'ouverture numérique 1,3, un milieu d'immersion d'indice 1,515 et une longueur d'onde de travail égale à  $633\text{nm}$ ,  $r_z = 0,562\mu\text{m}$  (cf. eq. 2.27).

Les piles ont donc été acquises sur des zones réduites de l'échantillon (ROI) ne comprenant qu'une seule bille et centrées sur cette dernière, avec un pas d'échantillonnage de  $0,2\mu\text{m}$  et un temps d'acquisition de  $5 \times 1$  seconde par image. L'acquisition de chaque pile a été répétée cinq fois afin de pouvoir faire la moyenne sur ces images et donc d'améliorer le rapport signal sur bruit. Ces piles ont ensuite été traitées sous Metamorph de sorte à supprimer le fond noir lié à l'électronique d'acquisition. Enfin, elles ont été moyennées et déconvoluées par le logiciel, afin d'en extraire une PSF du système présentant un meilleur rapport signal sur bruit que les piles originales.

En observant l'aspect de la PSF, on peut en déduire les aberrations détériorant la qualité des images. Nous avons pu constater qu'en utilisant un objectif fluorite  $40\times$  d'ouverture numérique 1,3 avec un achromat classique comme lentille de tube, la qualité du système d'imagerie est fortement détériorée par les aberrations et d'autant plus sévèrement que l'on s'éloigne de l'axe optique (cf. Figure 64). On distingue parfaitement l'astigmatisme sur la figure 64 (c) qui déforme les taches images et leur confère cette forme de croix. On constate également la présence d'aberration sphérique qui se traduit concrètement par la dissymétrie entre les taches de part et d'autre du meilleur foyer (cf. Figure 64 (a) et (d)).

Après optimisation de l'alignement et remplacement de la lentille de tube classique par une lentille de tube Nikon, optimisée pour fonctionner avec les objectifs du même fabricant, nous avons pu constater les améliorations. Cette fois, en travaillant avec un objectif aplanétique  $20\times$ , nous sommes parvenus à diminuer très sensiblement les aberrations de champ et l'aberration sphérique, comme le montre le montage d'images présenté sur la figure 65.

Les améliorations de notre système nous ont permis d'obtenir la PSF présentée à la figure 66. Cette dernière a été acquise avec l'objectif  $40\times$  au centre du champ. Celui-ci n'étant pas corrigé de la courbure de champ, on soulignera que les PSF en bord de champ ne présentent pas cette symétrie circulaire en raison de l'astigmatisme pour lequel il n'est pas corrigé. On

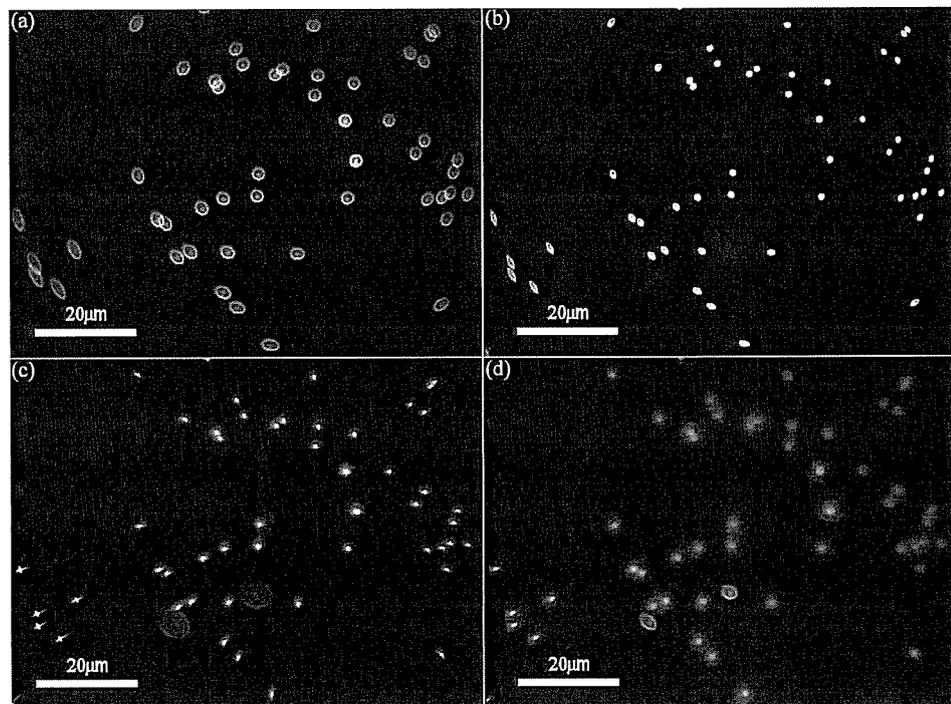


FIG. 64 – Impact des aberrations sur l'imagerie de billes de  $0,2\mu\text{m}$  de diamètre. Les images présentées sur cette figure sont extraites d'une pile de séquençage en  $z$  réalisée avec un objectif  $40\times$ , un pas de  $0,2\mu\text{m}$  et un temps d'acquisition d'une seconde par image.

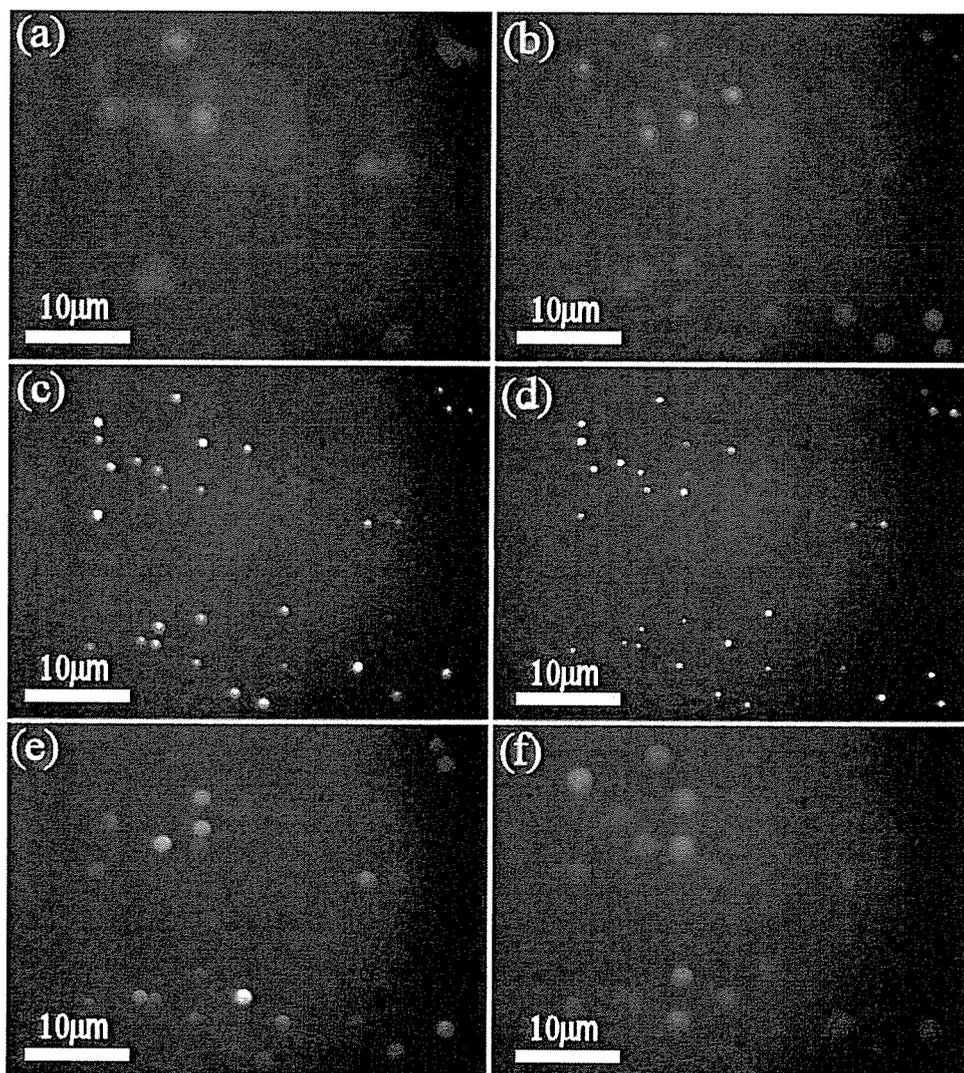


FIG. 65 – Montage d'images de billes de  $0,2\mu\text{m}$  de diamètre.

Les images présentées sur cette figure sont extraites d'une pile de séquençage en z réalisée avec un objectif  $20\times$  aplanétique, avec un pas de  $0,2\mu\text{m}$  et un temps d'acquisition d'une seconde par image.

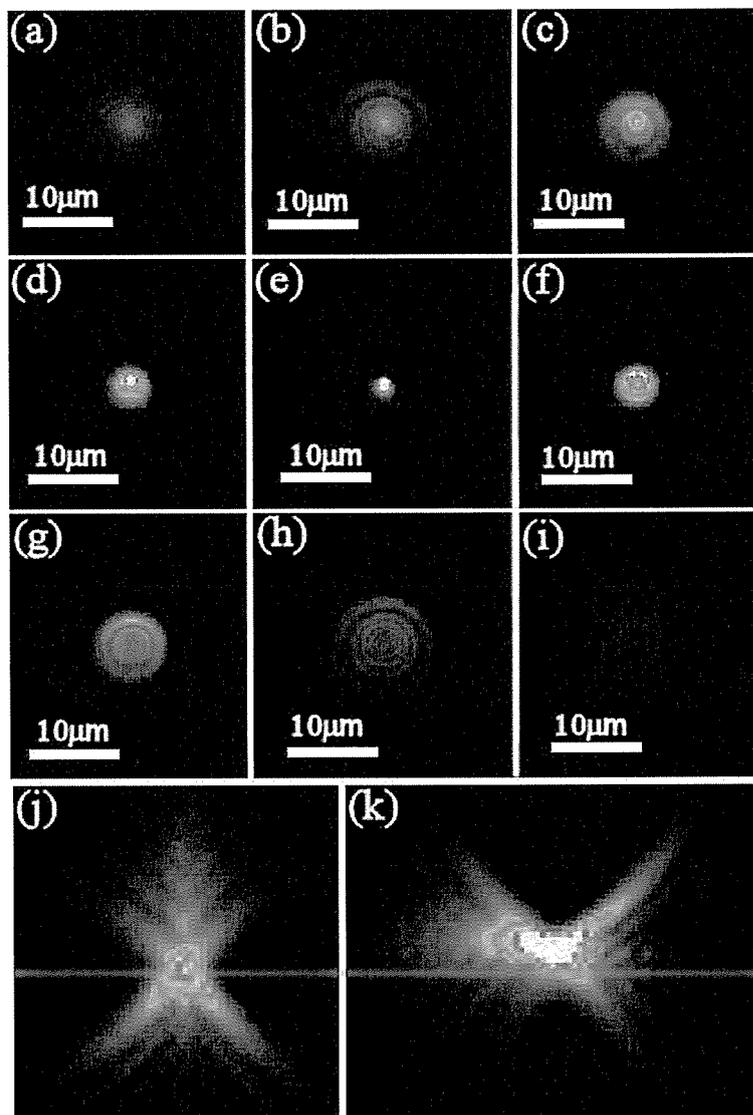


FIG. 66 – Montage d'une PSF acquise avec l'objectif 40 $\times$  au centre du champ. Les images (a) à (i) présentent une sélection de plans extraits d'une pile en  $z$ , réalisée avec un pas d'échantillonnage de  $0,2\mu m$  et un temps d'acquisition de  $5 \times 1$  seconde. L'écart le long de l'axe optique entre chaque image est de  $2\mu m$ . Les images j et k présentent respectivement les profils de la même PSF, suivant les axes XZ et YZ.

constate que, proche de l'axe optique, la PSF est très peu déformée par les aberrations. On remarque tout de même une légère dissymétrie suivant l'axe YZ comme le montre également le profil (k) pris suivant cet axe. On pourra attribuer ceci à un faible défaut de tilt des optiques sur la ligne de détection, défaut que nous tachons de corriger en mettant au point un processus optimisé d'alignement. On constate également que l'aberration sphérique est en grande partie corrigée.

Nous sommes donc parvenus à améliorer la qualité de notre système d'imagerie, en travaillant sur l'adaptation d'indice, le choix des éléments optiques et leur alignement. Cependant, l'objectif de plus grande ouverture numérique ( $40\times$ ,  $NA = 1,3$ ) dont nous disposons n'est pas corrigé des aberrations de champ. Ceci constitue un problème pour l'application à nos images de sondes, d'un algorithme de déconvolution qui nécessite une PSF unique et identique sur tout le champ image. Ainsi, nous projetons de faire l'acquisition d'un autre objectif aplanétique de grande ouverture numérique afin de pouvoir obtenir une PSF identique et non aberrante sur la totalité du champ image.

## 10 Les échantillons et le protocole d'hybridation

L'hybridation-in-situ est une des techniques d'histologie, les plus délicates, car elle requiert l'enchaînement de nombreuses étapes, chacune dépendant de la précédente [31][49]. Elle réclame un compromis entre trois objectifs globaux, à savoir, la conservation de la morphologie, la conservation des ARNs et l'accessibilité des ribosondes aux ARNs. Sa mise au point a donc réclamée un long travail, ponctué d'allers et retours entre les différents paramètres à tester et n'est, d'ailleurs, pas encore complètement optimisée. Dans cette partie, dévolue à la préparation des échantillons par FISH, je décrirai, dans un premier temps, les principales étapes entrant dans la mise en oeuvre du protocole d'hybridation : la cryosection, l'hybridation à proprement dite et la fabrication des sondes. Puis, dans un second temps, je ferai une brève introduction à la biologie du système mutant auquel nous avons fait appel afin de valider notre technique.

## 10.1 La cryosection

Ayant choisi de travailler avec un microscope grand champ, il est impossible d'imager des cerveaux entiers, car trop épais. Nous avons donc dû découper les cerveaux afin d'avoir accès à toutes les structures situées à différentes profondeurs. Afin d'y parvenir, deux techniques peuvent être mises en oeuvre : le découpage de coupes paraffines ou la cryosection.

La première de ces deux options qui consiste à découper les cerveaux inclus dans un bloc de paraffine, permet l'obtention de coupes de très bonne qualité et donc une conservation excellente de la structure des tissus. Malheureusement, elle est connue, chez les mammifères et les larves de drosophiles, pour dégrader les brins d'ARN. De ce fait, nous avons, dès le départ, écarté cette technique. La seconde, consiste à congeler les tissus et à les découper à basse température. Elle est beaucoup plus délicate que la précédente et la conservation des tissus est nettement plus critique. En effet, la procédure à suivre dépend de l'espèce, du stade de développement et des organes à découper. Une approche spécifique à chaque application est donc nécessaire ce qui la rend beaucoup plus longue et difficile à mettre en oeuvre. Durant nos expériences, nous avons testé deux protocoles de cryosection : la congélation ultra-rapide et la cryoprotection.

### 10.1.1 La congélation ultra-rapide

La congélation ultra-rapide a pour but de figer les structures cellulaires en évitant la formation de cristaux de glace, très destructive pour les tissus, permettant, in fine, de les observer dans leur état quasi-natif. Pour réaliser cette congélation, nous avons inclus les têtes de drosophiles dans un milieu d'enrobage (Tissu-Tek) liquide à température ambiante, puis les avons congelées par immersion dans de l'isopentane refroidis par un bain d'azote liquide. Enfin, en les plaçant dans un cryothome à  $-20^{\circ}\text{C}$ , nous les avons découpées en "tranches" de 8 microns d'épaisseur.

Cette technique ne nécessite aucune étape de fixation des cellules, ainsi elle n'entraîne aucune réticulation des tissus et permet une accessibilité excellente des sondes au matériel génétique. De ce fait, en appliquant ce protocole, nous sommes parvenus à obtenir des coupes présentant un marquage intense et bien spécifique. Malheureusement, la qualité des tissus, suite à la découpe, s'est avérée peu reproductible. Nous avons constaté, après découpe, que de

nombreux cerveaux (entre 3/4 et 9/10) étaient complètement inexploitable, rendant la statistique longue et difficile, probablement parce que les dimensions du cerveau de la drosophile sont un peu trop grande pour cette approche.

### 10.1.2 La cryoprotection

Cette seconde technique contrairement à la précédente comporte une étape de cryoprotection ayant pour but de substituer, en partie, l'eau contenue dans les tissus par une solution évitant la formation de cristaux de glace, afin de limiter les risques de dégradation lors de l'étape de congélation. Le problème inhérent à cette technique vient du délai supplémentaire qu'elle impose avant hybridation. En effet, lorsque la mouche meurt, la fabrication de l'ARN est stoppée, mais surtout, les RNases normalement confinées dans les lysosomes (des vésicules) sont relâchées dans le cytoplasme des cellules. La conséquence directe de l'action de ces enzymes est la destruction, par digestion, des ARNs que nous souhaitons étudier. Il est donc indispensable, pour mettre en oeuvre efficacement cette méthode, de fixer les cellules afin d'éviter la dégradation des ARNs en immobilisant les protéines, dont les RNases. Cette fixation revient, plus concrètement, à la création de ponts méthylènes entre amines primaires. Elle provoque la formation d'un réseau de protéines réticulées en particulier dans le cortex cellulaire (partie juste sous la membrane plasmique).

La capsule imperméable qui protège le cerveau constitue un obstacle à l'entrée des produits de fixation, il est donc nécessaire de faciliter leur pénétration en ouvrant une faille dans cette barrière. Pour ce faire, on anesthésie dans un premier temps les drosophiles sous CO<sub>2</sub>. On leur enlève leur trompe, et on fixe les tissus pendant quatre heures en les immergeant dans une solution de PFA (à 4 %). Vient ensuite l'étape de cryoprotection qui consiste à placer les cobayes dans un mélange PBS (Tampon phosphate) additionné de sucrose (18%) afin de prévenir la dégradation de la structure cellulaire lors de la congélation. Le lendemain, les têtes des mouches sont plongées dans du carboxyméthylcellulose afin de faciliter le découpage, elles sont ensuite congelées par immersion dans un bain d'azote liquide et découpées en cryosections de 8 microns d'épaisseur. La dernière étape consiste à fixer de nouveau les coupes en les plongeant, pendant vingt minutes, dans un bain de PFA afin d'éviter que les ARNs ne diffusent hors des cellules pendant le processus d'hybridation qui suit la cryosection.

Pendant ma thèse, nous avons testé un certain nombre de protocoles de cryoprotection.

Ici, j'en décrirai deux, dont les résultats nous ont permis d'avancer vers une procédure mieux optimisée. Dans un premier temps, nous avons fixé les cerveaux en les plongeant pendant quatre heures dans une solution de PFA, puis nous les avons placés toute une nuit dans une solution PBS-sucrose (cryoprotection). Ce protocole nous a conduits à l'obtention de belles coupes dont la structure était bien conservée et reproductible. Applicable, en principe, aux expériences de FISH comme d'immunohistochimie, cette approche ne donne de bons résultats que sur les coupes marquées par immunohistochimie. Il est important de noter que la réticulation des tissus, suite à la fixation, constitue un obstacle à la pénétration des sondes. Après un long temps de fixation, tel que celui utilisé dans ce protocole, les ribosondes semblent être dans l'incapacité d'atteindre les brins d'ARN et ne peuvent se fixer sur le matériel génétique visé. Nous avons donc diminué petit à petit ce dernier et avons abouti au second protocole que je détaille dans cette partie. Celui-ci a consisté en une unique étape de fixation d'une heure dans une solution de PFA, l'étape de cryoprotection ayant été supprimée, suite à une diminution graduelle du sucrose qui s'est avérée bénéfique pour le marquage. Nous sommes parvenus, grâce à ce nouveau protocole, à l'obtention de coupes de qualité reproductible et dont la morphologie est assez bien conservée. La présence de marquage relativement spécifique, suite à l'hybridation, a pu être vérifiée. Des efforts restent toutefois à faire afin d'optimiser la spécificité du marquage.

## 10.2 L'hybridation des échantillons

Les coupes ainsi obtenues sont alors préhybridées pendant une heure à  $42^{\circ}\text{C}$ . La préhybridation consiste à introduire, en grande quantité, des brins d'ARNs non spécifiques qui vont aller s'accrocher sur les brins d'ARNs des drosophiles, aussi bien sur ceux ciblés que sur les autres. Après cette étape de préhybridation, les coupes sont hybridées avec les ribosondes fluorescentes pendant toute une nuit, à une température entre  $42$  et  $56^{\circ}\text{C}$  selon le gène visé et la sonde utilisée. L'affinité entre la cible et les brins d'ARNs spécifiques est plus importante que celle existant entre cette dernière et les brins non spécifiques introduits lors de la préhybridation. Pendant l'hybridation, les brins non spécifiques vont donc être, en majorité, remplacés par les ribosondes spécifiques sur les brins d'ARNs ciblés. Ainsi, on limite au maximum l'hybridation non spécifique. La température de cette étape d'hybridation est un des

paramètres que nous avons testé afin d'obtenir un maximum de marquage spécifique. Une fois hybridées, les coupes sont rincées dans plusieurs bains de SSC (Standard Saline Citrate) à température, concentration saline et quantité de formamide variables, afin d'éliminer les sondes non hybridées. Ces différents paramètres ont également fait l'objet de tests afin de déterminer le poids de chacun d'entre eux et d'aboutir aux paramètres optimisant la spécificité du marquage. Idéalement, après ces rinçages, si les températures, durées d'hybridation et de rinçage, ainsi que la composition des solutions de rinçage ont été bien choisies, alors, seules les sondes hybridées spécifiquement doivent rester fixées sur les coupes. Le choix de la température d'hybridation est initialement guidé par la formule empirique de calcul de la température  $T_m$  (melting température) à laquelle 50% des brins d'ARN sonde forment des complexes avec la cible et 50% des brins sont dénaturés [49] :

$$T_m = 18,5 \cdot \log[Na^+] + 58,4 \cdot (\% [G + C]) - 5 \times (\% \text{Formamide}) + 79,8 - \frac{820}{Nb_{pb \text{ complexe}}} \quad (4.19)$$

Dans cette formule  $[Na^+]$  et  $\% \text{Formamide}$  correspondent à la concentration saline et au pourcentage de formamide dans le tampon d'hybridation,  $\% [G + C]$  désigne le pourcentage de base guanine,  $G$ , et Cytosine,  $C$ , dans la séquence de la sonde et  $Nb_{pb \text{ complexe}}$  représente le nombre total de paires de bases dont est constitué le complexe sonde/ARN cible.

La température d'hybridation est généralement choisie inférieure à  $T_m$  de  $15^\circ C$  à  $20^\circ C$ . Toutefois, la température idéale d'hybridation dépendant du nombre de nucléotides allant se fixer sur l'ARN d'intérêt, un tel choix revient à assumer que les sondes s'hybrident entièrement, sur toute leur longueur et qu'elles sont parfaitement conservées (pas de dégradation). Or, compte tenu de la fixation des tissus, l'intégrité des ARNs cibles et leur accessibilité peuvent être modifiées de sorte à limiter la longueur de la séquence pouvant être potentiellement marqué. De plus, la durée du processus complet étant assez longue (entre trois et quatre jours) et les ribosondes très fragiles, il est impossible d'assurer la conservation parfaite des sondes. La température obtenue par application de la formule 4.19 ne constitue donc qu'un point de départ, et nécessite une étude expérimentale systématique plus poussée. Dans nos expériences, nous avons pu constater que la partie de la sonde hybridée correspondait généralement à une longueur effective de moins de 100 bases pour des sondes dont la longueur totale est comprise entre 400 et 700 bases suivant le gène ciblé.

La température des différents rinçages, quant à elle, doit bien évidemment être prise inférieure à la température d'hybridation, afin de ne rincer que les sondes hybridées non spécifiquement. Le choix de la concentration saline et du pH des solutions de rinçage est également un point très important qui va déterminer l'efficacité du rinçage et donc la spécificité du signal de fluorescence que l'on mesurera sur les échantillons. Ce sont donc des paramètres qu'il nous a également fallu tester.

La dernière étape avant que nous puissions observer les coupes hybridées au microscope, est le montage. Les coupes sont immergées dans un milieu de montage (DakoCytomation, Fluorescent Mounting Medium) spécialement conçu pour l'imagerie de fluorescence qui permet de retarder la photodégradation des sondes et placées entre lame et lamelle. Elles sont ensuite séchées pendant 48h puis scellées avec du vernis à ongles non fluorescent.

Aux vues des nombreux paramètres à prendre en considération, on saisit toute la subtilité du processus d'hybridation et on comprend la complexité et l'ampleur des études d'optimisation sous-jacentes réclamant de nombreux aller-retours entre l'observation et la préparation. De ce fait, bien que des progrès importants aient déjà été réalisés, un travail conséquent reste à faire avant de pouvoir obtenir un protocole parfaitement optimisé.

### 10.3 Fabrication des sondes ARN

Les sondes que nous avons utilisées sont des ribosondes synthétisées par transcription *in vitro* de régions choisies d'ADN complémentaires de l'ARN cible. Ces ribosondes ont été réalisées à partir de clone EST (Expressed Sequence Tag), ADN plasmique (circulaire), double brin, dont la taille peut aller de quelques centaines à quelques milliers de paires de bases (pb). Le choix du clone c'est fait suivant le critère de recouvrement maximal du gène d'intérêt, parmi les nombreux disponibles dans les banques génomiques de drosophiles. Pour la synthèse de la sonde ARN, nous n'avons utilisé qu'une partie de la séquence ADN du clone. Nous avons donc sélectionné, grâce à un logiciel spécialisé (BLAST), une séquence de 400 à 700pb (suivant le gène étudié) spécifique du gène ciblé et présentant une homologie faible avec les autres gènes endogènes, afin de limiter le bruit de fond lié à l'hybridation non spécifique. Cette séquence a ensuite été amplifiée. Cette étape peut être réalisée par deux techniques. La première consiste à réaliser une transformation bactérienne, en introduisant la séquence dans un plasmide,

derrière un promoteur de transcription *in vitro*, du type promoteur bactériophage SP6 ou T7. L'amplification peut également être effectuée par réaction en chaîne par polymérase (PCR)<sup>39</sup> en ajoutant une amorce contenant un promoteur de type SP6. Nous avons utilisé les deux approches, mais souvent choisi la première technique, plus fiable, et avons inséré le brin d'ADN à amplifier contenant des promoteurs de transcription de l'ARN : SP6 et T7, situés de part et d'autre du gène d'intérêt. Les brins d'ADN sont alors transcrits en ARN. Le marquage des ARNs est obtenu en substituant, pendant la transcription, 1/3 des molécules d'uracile par des uraciles marqués avec une molécule de Cy5 (disponibles dans le commerce). Une étape de vérification de la pureté et du taux de marquage des sondes vient ensuite. Celle-ci consiste à mesurer l'absorption des sondes à plusieurs longueurs d'onde 260, 280, 650 et 700nm. Les deux premières longueurs d'onde correspondent à deux raies d'absorption des nucléotides et des éventuelles impuretés (protéines restées à l'issue de la transcription). Le rapport des intensités de ces deux raies d'absorption permet de vérifier la pureté des brins d'ARN. Les deux autres longueurs d'onde correspondent respectivement au maximum et au pied de la courbe d'absorption du Cy5. Ainsi, en calculant le rapport de ces dernières, il est possible de quantifier le nombre de fluorophores présents sur les sondes. Le taux de marquage, obtenu lors des différentes synthèses que nous avons réalisées, varie entre un nucléotide marqué sur soixante et un nucléotide marqué sur quatre-vingt-dix soit une molécule d'uracile marquée sur quinze à une sur vingt-deux. Le taux de marquage est beaucoup plus faible que le nombre initial d'uracile marquée car la polymérase les intègre moins facilement que l'uracile naturelle. Ces sondes, très fragiles, sont, en dernier lieu, nettoyées et stockées à  $-80^{\circ}C$ . Elles constituent les sondes ARN avec lesquelles nous allons hybrider les cerveaux des drosophiles à étudier. Le choix concernant la taille de la sonde va influencer sur la pénétration des sondes et sur la spécificité du marquage, c'est donc un paramètre que nous avons fait varier.

<sup>39</sup>La réaction en chaîne par polymérase (PCR en anglais pour Polymérase Chain Réaction), est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier une séquence spécifique d'ADN, à partir d'une quantité très faible (jusqu'à une copie) de matériel génétique. Cette technique est basée sur la combinaison de deux facteurs : les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation « ADN double brins spécifique » des « ADN polymérase ADN dépendantes thermostables ». Elle consiste en une répétition de cycles de transition de température alternant des phases de dénaturation des brins d'ADN, des phases d'hybridation ou d'appariement des amorces et des phases d'élongation. La répétition de ces cycles s'effectuant jusqu'à obtention de la quantité voulue de répliques.

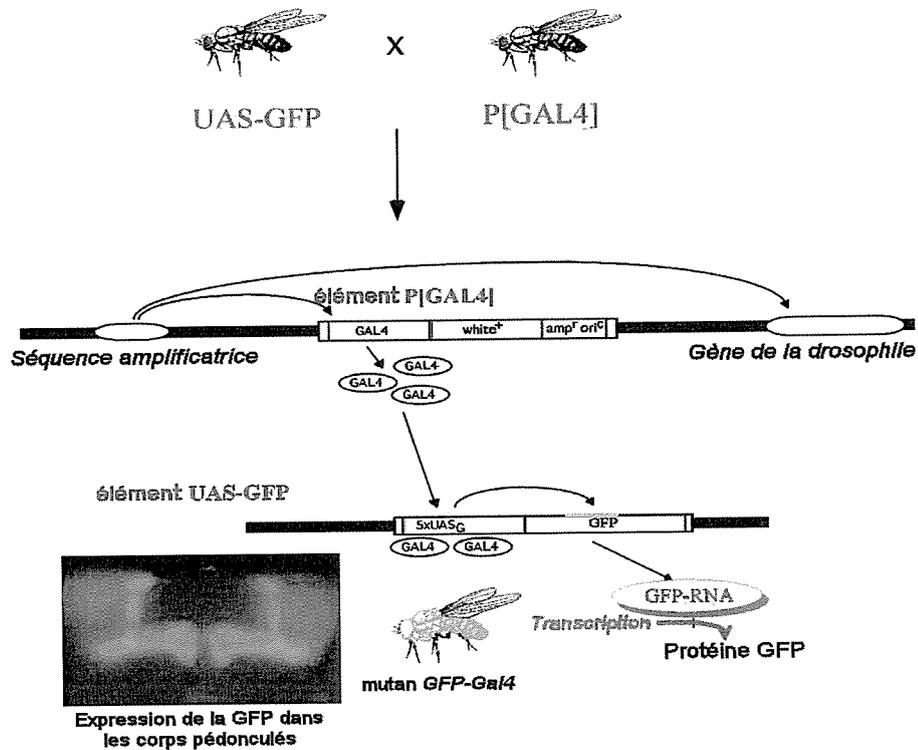


FIG. 67 – Mécanisme de synthèse de la GFP chez le mutant *GFP-Gal4*. Le croisement entre une souche *UAS-GFP* et une souche *P[Gal4]* permet d'obtenir une nouvelle souche exprimant spécifiquement la GFP dans les cellules capables de synthétiser la protéine Gal4. La séquence *white+* permet de vérifier que le gène *Gal4* a bien été inséré entre deux séquences de transcription, car elle entraîne une coloration particulière des yeux.

#### 10.4 *GFP-Gal4* un modèle de validation

Avant d'entreprendre des expériences visant à étudier un gène potentiellement impliqué dans la mémoire olfactive, il nous a fallu valider notre protocole d'hybridation. Pour y parvenir nous avons recherché un système qui nous permettrait de vérifier la spécificité de l'hybridation et donc pour lequel nous serions à même de connaître le plus précisément possible les régions d'expression du gène ciblé. Ains, nous avons fait appel à une souche de drosophiles mutantes. Les mouches que nous avons utilisées appartiennent à la lignée *GFP-Gal4*. Elles expriment spécifiquement la protéine GFP dans certaines cellules connues du cerveau. En travaillant avec des individus appartenant à cette souche, et en marquant les ARNs codant pour la GFP, nous avons pu tester la compatibilité de nos résultats avec ceux attendus.

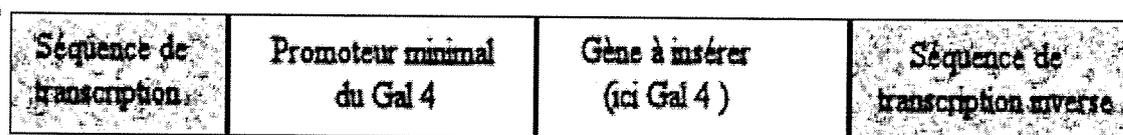


FIG. 68 – L'élément P Gal4.

Ce schéma présente un élément P Gal4 défectif. On notera que les séquences de transcription ne font pas partie de l'élément P, mais décrivent la configuration dans laquelle cet élément P est exprimé.

L'objet de ce paragraphe est de vous présenter les manipulations génétiques mises en oeuvre afin d'obtenir cette lignée, ainsi que les différents outils génétiques permettant l'expression du gène de la GFP spécifiquement dans certaines cellules.

Les mouches de la lignée *GFP-Gal4* sont issues de croisements entre individus de la lignée *UAS-GFP* et de la lignée *P[Gal4]* (cf. Figure 67).

Les drosophiles *UAS-GFP*, présentent dans leur code génétique, suite à une précédente transgénèse, une séquence promoteur UAS suivie du gène de la GFP. Le rôle du promoteur étant d'activer la synthèse du gène dont la séquence est située juste après lui, c'est lui qui va pouvoir déclencher la synthèse de la GFP. La particularité du promoteur UAS est qu'il ne peut être activé qu'en présence d'une substance naturellement absente des cellules : le Gal4.

Les individus appartenant à la lignée *P[Gal4]* présentent dans leur code génétique un élément transposable défectif, dit élément P (cf. Figure 68). C'est une séquence d'ADN qui, lors de la mitose<sup>40</sup> (division cellulaire), sous l'action d'enzymes de type transposase, peut sauter d'une position à une autre dans le génome et qui est facilement introduite chez les embryons. L'élément *P[Gal4]* présente la particularité de permettre le contrôle de l'expression du Gal4 par des gènes (promoteurs) environnant cet élément. Il existe de nombreux mutants *P[Gal4]*, chacun exprimant la protéine Gal4 dans des régions de l'organisme bien définies. Ces mutants sont disponibles dans des banques avec, pour certains, la cartographie des zones d'expression. Ainsi l'utilisateur peut choisir le mutant qui lui convient.

Parmi ces derniers, nous avons sélectionné un mutant *P[Gal4]* identifié comme déclenchant la synthèse du Gal4 dans les cellules des corps pédonculés. Le croisement de cette lignée

<sup>40</sup>La mitose désigne le phénomène de division cellulaire. Il s'agit d'une duplication « non sexuée » (contrairement à la méiose). Division d'une "cellule-mère" en deux "cellules-filles".

avec des individus de la lignée *UAS-GFP* nous a permis d'obtenir des drosophiles *GFP-Gal4* exprimant la GFP dans les cellules des corps pédonculés. Le choix d'un mutant GFP s'explique par le besoin de pouvoir visualiser directement les zones d'expression de la protéine marquée par hybridation.

## 11 Validation et application de la méthode

La démarche expérimentale que nous avons suivie peut être découpée en trois étapes : mise au point et validation du système optique et des différents protocoles d'hybridation sur une mouche mutante GFP, vérification de l'applicabilité de la méthode sur un gène "réel", naturellement présent dans le génome de la drosophile, localisation et étude des variations d'expression d'un nouveau gène candidat pour être impliqué dans la mémoire olfactive à long terme [96][34][115][95].

### 11.1 Validation sur un mutant GFP

Les premières expériences que nous avons menées visaient à évaluer les performances de notre détection et à prouver la spécificité du marquage observé. Pour parvenir à cet objectif nous avons utilisé une souche de drosophile mutante de la lignée *GFP-Gal4*. Ces mouches, issues du croisement entre la lignée *UAS-GFP* et la lignée *P[Gal4]* (cf. paragraphe 10.4), ont pour particularité de n'exprimer la protéine GFP que dans certaines cellules connues du cerveau (cf. Figure 69) de la drosophile, grâce à une séquence d'activation de la synthèse de l'ARN de GFP présente uniquement dans ces cellules.

Ainsi, en marquant par hybridation-in-situ l'ARN de GFP par une sonde longue d'environ 750 bases avec  $10 \pm 3$  molécules de Cy5 par sondes, il nous a été possible de comparer les zones marquées, détectées par imagerie de fluorescence, avec celles dans lesquelles on s'attend à ce que la GFP soit exprimée. De cette façon nous avons pu vérifier la spécificité du marquage par FISH, la reproductibilité du protocole d'hybridation, et l'efficacité de la détection. On notera toutefois que le recouvrement entre les zones dans lesquelles on détecte la GFP et celles dans lesquelles nous devrions détecter l'ARN codant pour cette même protéine, n'est pas parfait. En effet, l'ARN reste confiné dans les somas des cellules neuronales (cf. Figures

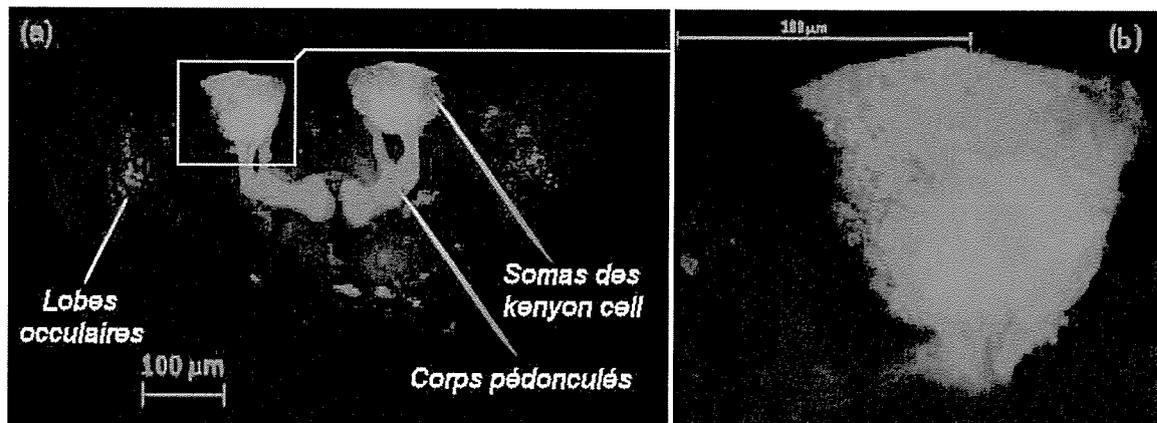


FIG. 69 – Image confocale en fluorescence des molécules de GFP synthétisées chez les mutants *Gal4-GFP*. L'image (a) présente le cerveau dans sa globalité. On notera la présence de fluorescence dans les corps pédonculés avec un pic d'expression dans la zone des calices et des somas des cellules de Kenyon présentée sur l'image (b). Sur l'image (b) on remarque également la forme arrondie des corps cellulaires dont la taille est de l'ordre de 1 à 2 microns.

48 et 49, paragraphe 8.2.2) tandis que les protéines peuvent migrer dans les dendrites et les axones. Il y a donc recouvrement uniquement au niveau des sources.

Quelques-uns des résultats obtenus sur des coupes de mouches mutantes *GFP-Gal4*, réalisées en appliquant le protocole de congélation ultra-rapide (cf. paragraphe 10.1.1 de ce chapitre), sont présentés sur la figure 70. On peut comparer ces images à celles de la figure 69 qui correspondent à l'imagerie directe de la GFP synthétisée par cette même souche de mutants. Sur l'image (a) acquise au microscope confocal, on constate d'une part que la zone des calices et des somas des cellules de Kenyon, visualisées avec un plus fort grossissement sur la figure (b), sont très marquées, mais également qu'il existe des zones d'expression de la GFP dans les lobes oculaires et dans le bas du cerveau. Sur les coupes marquées par notre protocole de FISH, on retrouve un niveau de fluorescence élevé dans ces mêmes zones et ce uniquement dans les régions où nous l'attendions. Ainsi, nous avons vérifié la spécificité de l'hybridation. De plus, malgré une résolution latérale limitée par la faible ouverture numérique des objectifs utilisés ( $1,287\mu\text{m}$  pour l'objectif  $10\times$  et  $0,515\mu\text{m}$  pour l'objectif  $20\times$ ), on distingue déjà les parois cellulaires (cf. Figure 70(c)) des somas dont la taille est d'environ  $2\mu\text{m}$ . Toutefois, aux vues de la figure 70, on constate qu'il existe sur toutes les images un marquage non spécifique sur tout le pourtour des cerveaux (cuticule) et au centre des

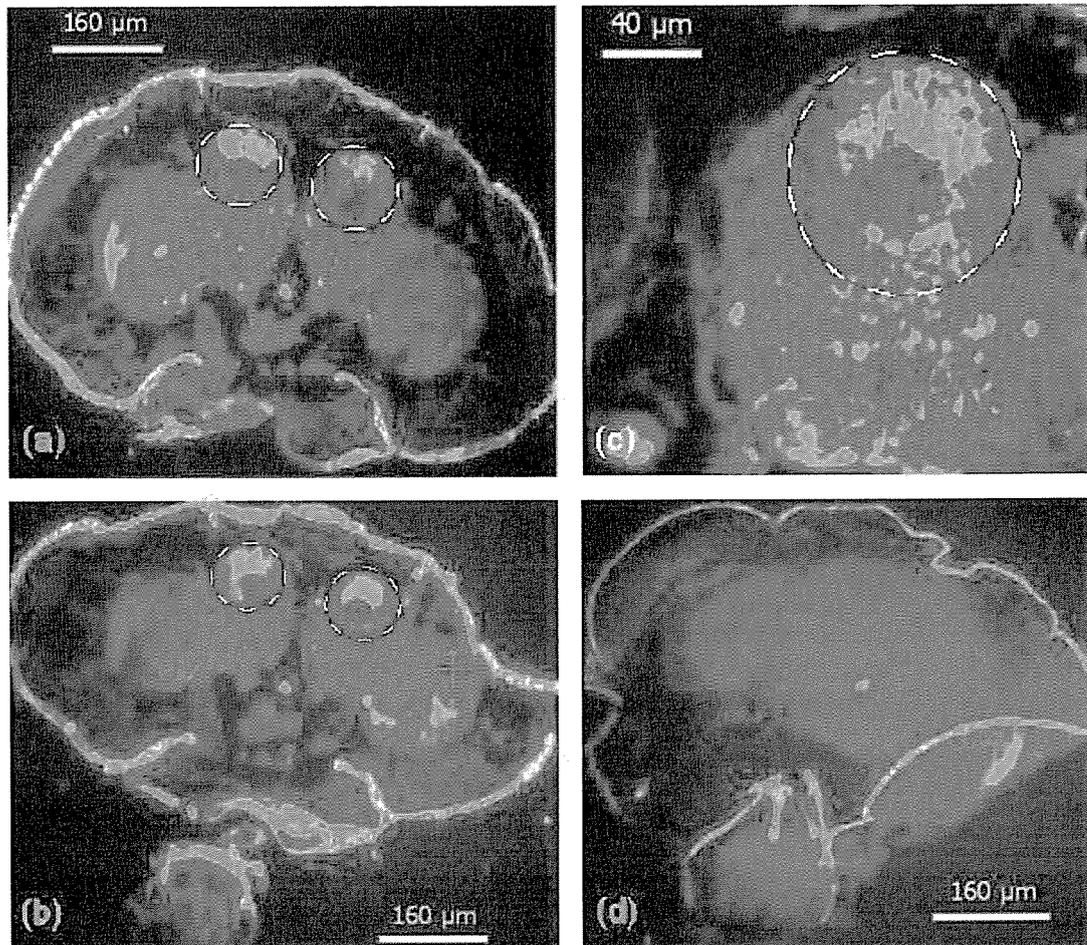


FIG. 70 – Images en fluorescence de coupes de mouches *GFP-Gal4* avec marquage FISH-Cy5 ciblé sur le gène de la GFP. Les images ont été acquises sur des coupes de  $8\mu m$  d'épaisseur. Les images (a), (b) et (d), ont été prises avec un objectif Nikon Plan fluo  $10\times$ ,  $NA = 0,3$  et l'image (c) avec un objectif Nikon Plan Apochromat  $20\times$ ,  $NA = 0,75$ . Les images (a) (b) et (c) correspondent à des coupes prises chez différents individus dans différentes zones du cerveau. Les coupes (a) et (b) sont situées dans la zone des calices et des somas (corps cellulaires) des cellules de Kenyon (encadrées) et la coupe (d) se situe dans une zone du cerveau où la GFP ne doit pas être exprimée. L'image (c) enfin est un zoom de la coupe (a) effectué dans la zone des somas des cellules de Kenyon.

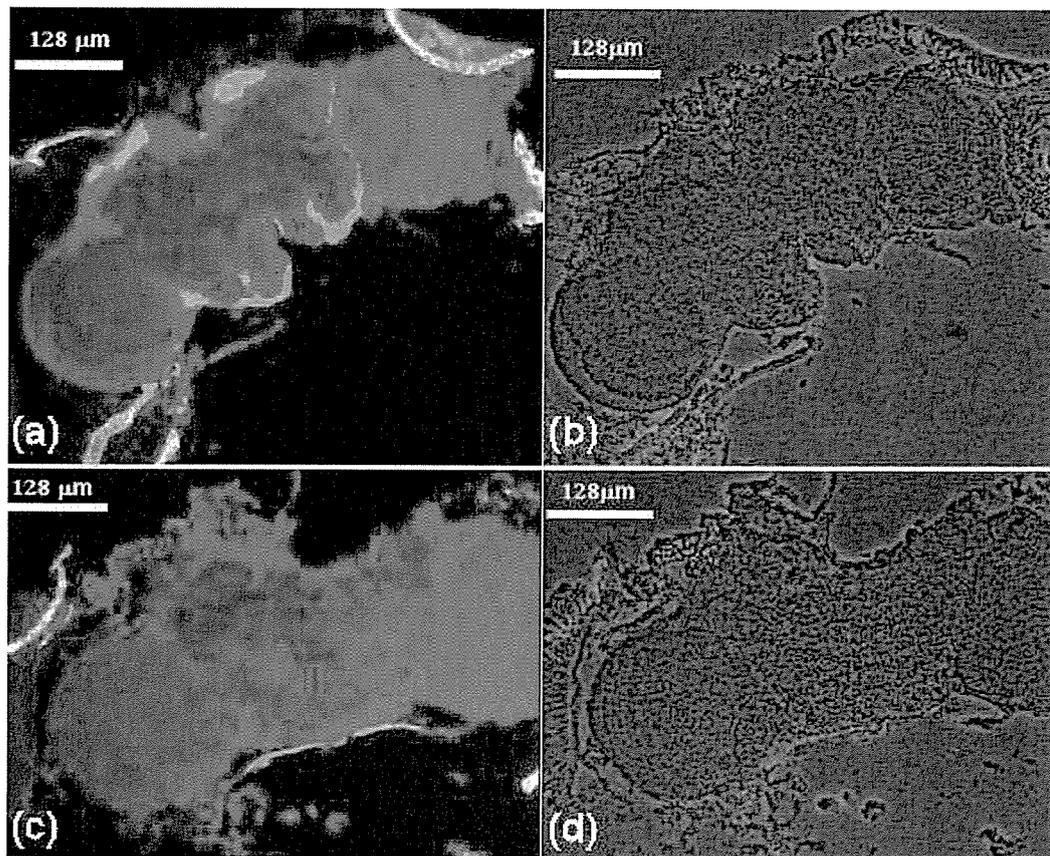


FIG. 71 – Étude de la spécificité du marquage par comparaison du signal de fluorescence sur les lignées de drosophiles *GFP-Gal4* mutantes (a et b) et *CS* sauvages (c et d). Ces images ont été acquises avec l'objectif  $10\times$ ,  $NA = 0,3$ , sur des coupes de  $8\mu m$  d'épaisseur. Elles sont présentées sur la même échelle de teinte. Les images (a) et (c) ont été prises en fluorescence, (b) et (d) correspondent aux images topographiques en contraste de phase de ces mêmes coupes.

coupes (tube digestif). Ces deux organes étant recouverts d'une couche de cire capable de créer une interaction forte avec nos sondes, il est impossible de supprimer ce signal parasite. Cependant, ces zones ne correspondant à aucun organe impliqué dans la mémoire, ce signal ne constitue pas une source d'erreur.

Ainsi, cette première série d'expérience nous a permis de prouver, la faisabilité d'une hybridation-in-situ directe chez la drosophile adulte, sa spécificité, sa reproductibilité et enfin l'efficacité de la détection développée au laboratoire [96]. Afin de confirmer la spécificité du marquage, nous avons également réalisé une série d'expériences comparatives en étudiant des coupes de drosophiles sauvages (non mutées) de la lignée *CS* (Canton Spécial) et de mutantes

de la lignée *GFP-Gal4*. Ces dernières réalisées en appliquant le protocole de cryoprotection sans sucrose que nous avons développé (cf. paragraphe 10.1.2 de ce chapitre), présentent une conservation des tissus meilleure que celles présentées à la figure 70, mais le marquage est un peu moins spécifique. Notre expérience a consisté à appliquer le processus de marquage avec nos sondes GFP, sur les coupes réalisées à partir de spécimens de ces deux lignées, disposées sur la même lame. Les drosophiles natives *CS* n'exprimant pas la GFP, nous souhaitions vérifier qu'aucun marquage ne serait détecté dans les zones où, chez les individus de la lignée *GFP-Gal4*, la GFP est exprimée. En se reportant à la figure 71, on constate bien que seules les coupes issues de la lignée *GFP-Gal4* présentent du marquage (cf. images (a) et (b)) et que ce dernier est bien localisé dans la région où nous l'attendions : dans la zone des somas des cellules de Kenyon. De nouveau, nous avons pu démontrer la spécificité de notre méthode d'hybridation-in-situ.

## 11.2 Application à un gène réel connu

La technique étant validée sur les mutants *GFP-Gal4*, nous l'avons appliquée à un gène réel, *crammer* (*Cer*), connu comme étant impliqué dans les mécanismes de la mémoire olfactive à long terme et plus particulièrement dans la plasticité synaptique [27]. L'étude menée sur ce gène a été réalisée par D. Comas et al. sur la lignée *P(cer-GFP)*. La mutation subie par les individus de cette lignée consiste à fusionner, juste après le promoteur de transcription du gène *crammers*, le gène de la GFP avec celui codant pour *Cer*. Ils ont ainsi démontré la présence de ce gène dans les somas des cellules de Kenyon et dans les cellules gliales autour des calices des corps pédonculés.

Étant à même de connaître au moins certaines des zones d'expression du gène de fusion *cer-GFP*, nous avons réalisé nos expériences de FISH sur la lignée *P(cer-GFP)*. Pour vérifier que les zones d'expression du gène *Cer* pouvaient être détectées par notre méthode, nous avons fabriqué une sonde antisens spécifique visant la partie catalytique (protéine) du gène et dont la longueur était d'environ 500 bases (soit entre six et huit molécules de Cy5 par sondes suivant les lots synthétisés). La figure 72 présente quelques résultats obtenus sur les coupes hybridées de mutants *P(cer-GFP)* réalisées en utilisant notre protocole de cryoprotection avec sucrose. Comme pour les mutants *GFP-Gal4*, le signal se retrouve bien spécifiquement

dans les zones où nous l'attendions (cf. Figure 72 (a) et (c)) et est bien absent des parties du cerveau où nous ne l'attendions pas (cf. Figure 72 (d)). Dès lors, même si toutes les étapes ne sont pas encore optimisées, nous pouvons appliquer notre protocole d'hybridation à l'étude d'un gène réel.

### 11.3 Étude du gène Tequila

La suite logique des deux expériences précédentes était bien évidemment l'application de notre technique à l'étude d'un gène, susceptible d'être impliqué dans le fonctionnement de la mémoire olfactive à long terme, afin d'en tirer des conclusions sur sa fonction et le lieu de son expression. Le gène sur lequel nous avons travaillé, *tequila*, est un gène orthologue<sup>41</sup> au gène *PRSS12* ou gène de la neurotripsine. Laurence Colleaux et son équipe [101] ont suggéré l'implication du gène humain dans une pathologie de retard mental non syndromique. Ce genre de pathologie, dite non syndromique, ne peut être détecté par IRM, car les patients ne présentent aucun défaut apparent de développement cérébral. Ainsi, se pose une question importante pour l'étude de la maladie : le gène *PRSS12* joue-t-il un rôle développemental tardif, c'est-à-dire durant la fin de la formation cérébrale, ou joue-t-il un rôle physiologique, autrement dit, intervient-il pendant le processus de mémorisation. Malheureusement, chez l'homme il est extrêmement difficile d'étudier le rôle de ce gène, la palette d'outils utilisables étant réduite, en partie pour des raisons éthiques. Il est donc nécessaire d'avoir recours à un modèle animal présentant un gène orthologue et pour lequel on dispose d'outils génétiques puissants. La drosophile est un bon candidat. En effet, comme je l'ai dit précédemment, il existe chez la drosophile un gène appelé *tequila* orthologue du gène humain *PRSS12*. De plus, les mouches présentant une mutation sur le gène *tequila* récapitulent en partie le phénotype de la maladie humaine. En effet, une mutation entraînant l'arrêt de la synthèse de *tequila* se traduit, chez la drosophile, par un défaut de la mémoire à long terme (cf. Figure 73). Comme chez l'homme, elle n'engendre aucun défaut visible de l'anatomie globale du cerveau, dans les limites de la résolution des systèmes optiques utilisés. Afin de mieux comprendre le rôle de ce gène, nous avons cherché à suivre par FISH la dynamique de son expression après

<sup>41</sup>Deux gènes orthologues sont issus d'un même gène, mais ont évolué par spécialisation vers deux versions de ce gène, propres à deux espèces différentes. Dans la plupart des cas, les orthologues conservent une même fonction au cours de l'évolution. Ainsi l'identification des orthologues est extrêmement importante, afin de pouvoir prédire le rôle d'un gène dans un génome nouvellement séquencé.

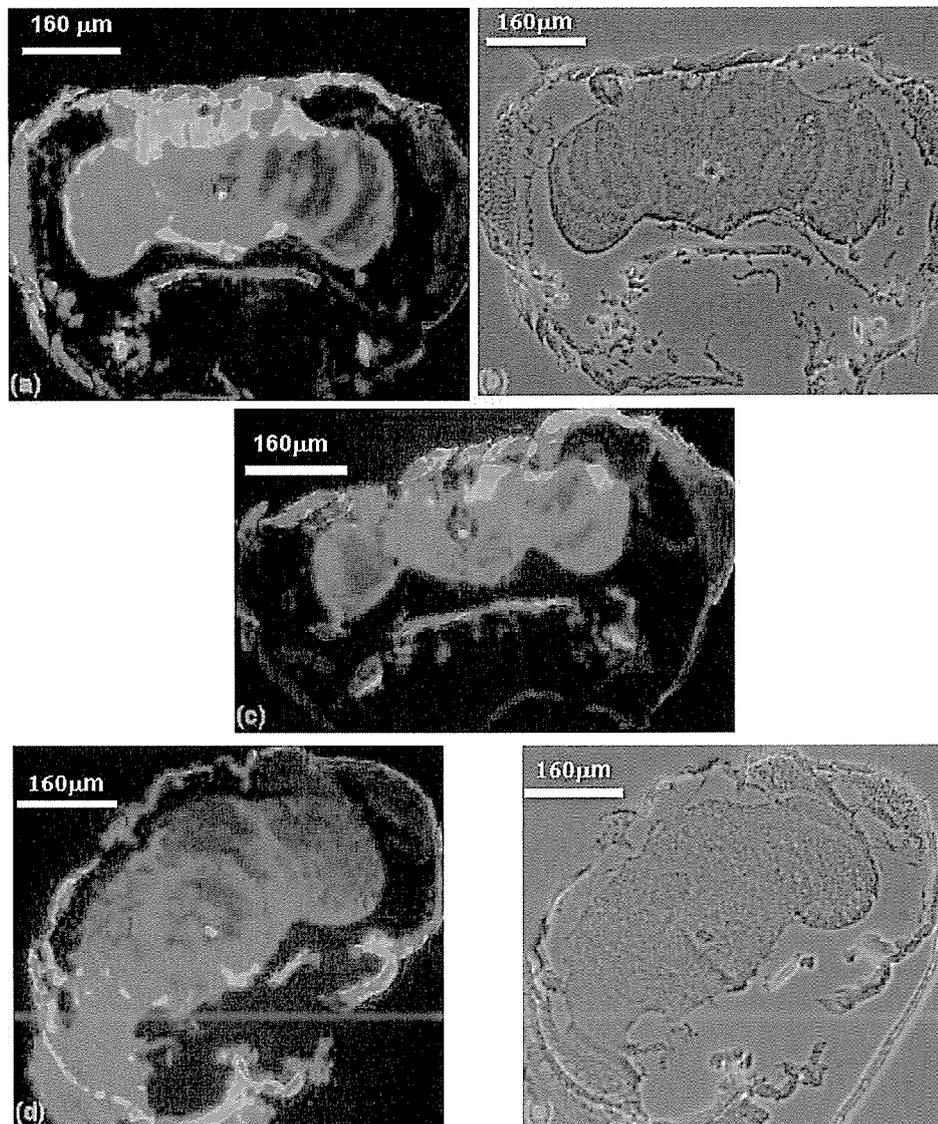


FIG. 72 – Coupes de mouches mutantes *Cer*, avec marquage FISH-Cy5 ciblé sur le gène *crammer*. Les images présentées sur cette figure ont toutes été acquises avec l'objectif Nikon 10×,  $NA = 0,3$ , sur des coupes de  $8\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les images (a), (c) et (d) sont des images de fluorescence alors que les images (b) et (e) correspondent respectivement aux images en contraste de phase des spécimens (a) et (d). Les images (a) et (c) représentent deux coupes marquées spécifiquement dans les somas des cellules de Kenyon. L'image (d), quant à elle, fut prise sur une zone du cerveau dans laquelle les corps pédonculés ne sont plus présents et où nous n'attendons pratiquement pas de marquage.

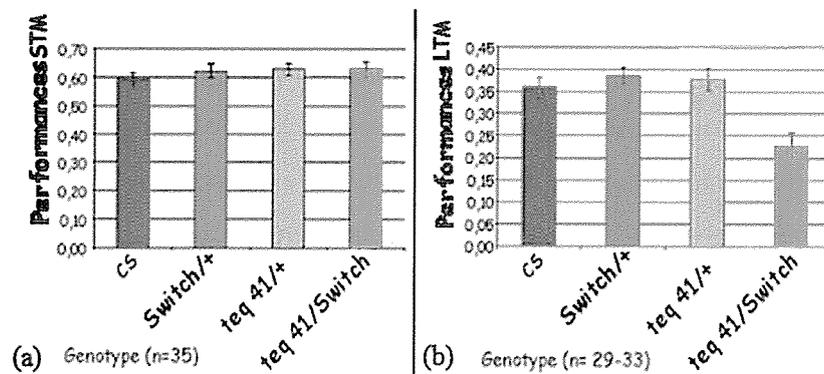


FIG. 73 – Étude des mémoires à court (STM) et long terme (LTM) lorsque la synthèse de Tequila est bloquée.

Les histogrammes (a) et (b) présentent les résultats d'études comportementales réalisées sur différentes souches de drosophiles sauvages (*CS*) ou mutantes (*Switch/+*, *teq41/+*, *teq41/Switch*). Les trois premières souches de mouche correspondent à des contrôles. La souche *CS* est la référence et les souches *Switch/+* et *teq41/+* sont des contrôles destinés à vérifier que les différentes étapes de mutation ne modifient pas le comportement des individus étudiés. La souche *teq41/Switch*, comme nous le verrons par la suite, est une souche pour laquelle nous avons pu stopper l'expression de *tequila* lors du processus d'apprentissage. Le graphique (a) présente l'étude de l'impact de l'absence d'expression de *tequila* sur la mémoire à court terme et (b) présente le pendant de cette dernière pour l'étude de la mémoire à long terme.

conditionnement des drosophiles.

Pour mettre en place nos expériences, nous avons développé une nouvelle sonde dirigée contre l'ARN *tequila*, longue d'environ 600 bases et marquée par sept à dix fluorophores. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur la souche de drosophiles sauvages *CS* sur laquelle nous avons cherché à étudier, d'une part, les zones d'expression du gène *tequila*, mais également, l'évolution de son niveau d'expression en fonction du conditionnement subi par l'individu étudié.

Les résultats que nous avons obtenus [34] grâce à cette étude, sont présentés sur la figure 74. Les images (c) et (d), prises dans la zone arrière du cerveau correspondant à la région des somas des cellules de Kenyon (KC), des calices (Ca) et des ponts (PB), présentent respectivement l'expression basale du gène *tequila* chez l'individu naïf (n'ayant subi aucun conditionnement) (c) et l'expression maximale quatre heures après conditionnement (les images intermédiaires ne sont pas présentées ici) (d). On remarque, en observant l'image (c), qu'à l'état basal, même si le niveau d'expression est faible, *tequila* est clairement exprimé

dans les somas des cellules de Kenyon (KC), un des centres de la mémoire. On peut, là encore, faire l'analogie avec le gène humain qui s'exprime relativement fortement dans l'hippocampe, organe impliqué dans les processus de mémorisation. En évaluant le niveau d'expression basal par mesure du signal dans les somas des cellules de Kenyon (sans soustraire le fond d'autofluorescence) et en le comparant au niveau maximal d'expression dans cette même région du cerveau, nous avons mesuré une augmentation du signal de fluorescence d'au moins un facteur dix. Cependant, le niveau basal étant très faible, de l'ordre de la moitié ou du tiers du niveau de fond d'autofluorescence, on peut penser que ce facteur est sous estimé d'un facteur deux ou trois. L'importance de l'incertitude sur la mesure a donc motivé le développement d'un protocole quantitatif que je décris au paragraphe suivant. Les variations du niveau d'expression, mesurées lors de nos expériences, sont confirmées par des mesures de RT-PCR quantitative<sup>42</sup>, présentées à la figure 75.

Afin de confirmer les résultats obtenus par FISH, nous avons réalisé, avec les biologistes du laboratoire de Neurobiologie et Diversité cellulaire de l'ESPCI, une expérience d'immunohisto chimie rendue possible par l'existence de l'anticorps polyclonal spécifique au gène *tequila*. Les résultats de cette expérience sont présentés sur les images (e), (f), (g) et (h) de la figure 74. Les coupes y figurant ont été réalisées en appliquant notre protocole de cryoprotection avec sucrose (cf. paragraphe 10.1.1 de ce chapitre). Les images (e) et (f) montrent que le niveau basal d'expression chez l'individu naïf n'est pas mesurable. Par contre, les images (g) et (h) illustrent le pic d'expression de la protéine, cette fois, cinq heures après conditionnement. Le décalage d'une heure entre ce résultat et celui obtenu en FISH provient du temps nécessaire à la traduction des ARNm en protéines.

Ainsi les deux expériences permettent de conclure que le gène *tequila* intervient durant le processus de mémorisation, et qu'il joue un rôle fonctionnel dans la plasticité synaptique, nécessaire à la mémorisation à long terme.

Des études supplémentaires abordant le problème par la voie du comportement ont éga-

---

<sup>42</sup>L'acronyme RT-PCR signifie Reverse Transcriptase PCR, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc) par l'enzyme RT. En réalité, il s'agit d'une PCR "classique" réalisée sur un ADN complémentaire (ou ADNc), qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse.

La RT-PCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR. Elle est également très utile pour quantifier des ANRs, parfois présents en infime quantité, en utilisant l'ADNc produit par la RT pour effectuer une PCR.

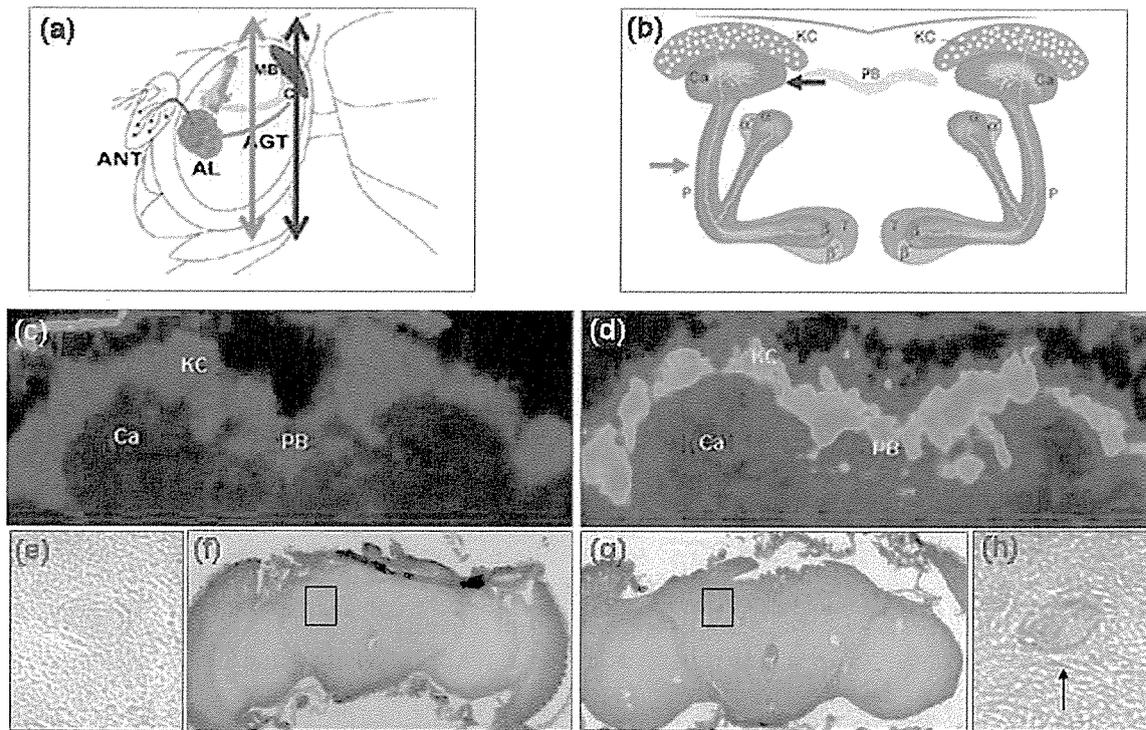


FIG. 74 – Étude des variations de l'expression du gène *tequila* chez la drosophile native *CS*. Les figures (a) et (b) présentent respectivement une coupe sagittale et frontale du cerveau d'une drosophile sur lesquelles sont représentées par des flèches bleues la région visualisée sur les images (c) et (d) et par des flèches jaunes celle correspondant aux images (e), (f), (g) et (h). Les images (c) et (d) sont des images de FISH réalisées sur des coupes de  $8\mu\text{m}$  d'épaisseur avec l'objectif  $10\times$ ,  $NA = 0,3$ , sur une mouche naïve (c) et sur mouche tuée quatre heures après avoir subi un conditionnement spécifique de la mémoire à long terme (d). Les images (e), (f), (g) et (h) sont le pendant de cette expérience réalisée cette fois-ci en immunohistochimie. (e) et (h) sont des agrandissements des zones encadrées sur les images (f) et (g) qui correspondent respectivement au marquage d'une mouche naïve (f) et d'une mouche tuée cinq heures après avoir subi le processus de conditionnement (g).

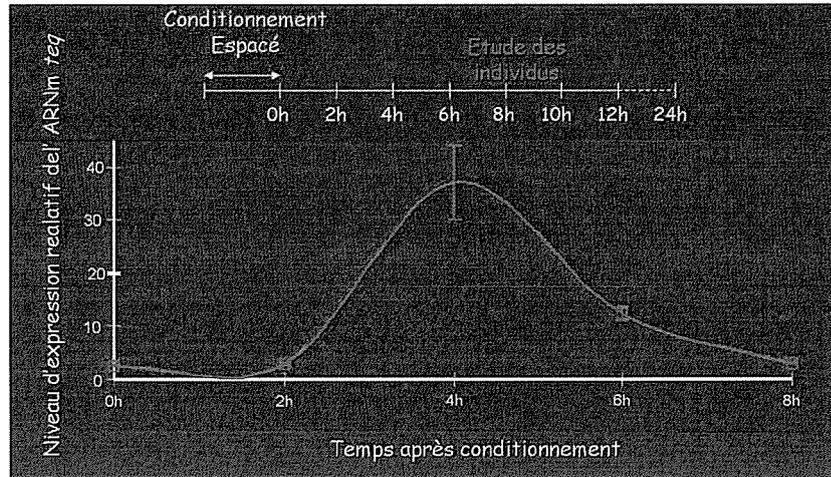


FIG. 75 – Évolution du niveau d'expression de l'ARNm tequila à différents instants après conditionnement.

lement été réalisées sur différentes lignées, dans les laboratoires de l'ESPCI (cf. Figure 76). Le but de ces expériences étant de confirmer le rôle fonctionnel du gène *tequila*, nous avons utilisé une souche de mutant *RNAi teq 41/Switch*, pour laquelle nous avons pu bloquer temporairement l'expression du gène pendant la durée du conditionnement et des tests, sur des individus ayant subi un développement normal (expression du gène non bloquée pendant la croissance). Chez les individus de cette lignée, l'arrêt de l'expression de *tequila* s'effectue grâce à un système d'ARN interférant (ARNi) (cf. Figure 76 (a)). L'interférence ARN est un mécanisme cellulaire probablement développé pour la lutte antivirale et le contrôle des éléments transposables du génome. Lorsqu'un ARN double brin (normalement l'ARN issu de la transcription est simple brin) est présent dans les cellules, non seulement il est dégradé, mais les ARNs simple brin qui comportent des séquences analogues d'au moins une vingtaine de bases le sont également. En exprimant artificiellement, sous forme double brin, une partie du gène cible (ARNi) dans certaines cellules, on inhibe son expression de façon spatialement ciblé. Un système relativement complexe, de promoteur inductible, permet, de plus, de contrôler l'expression de l'ARNi dans le temps. La transcription de ce dernier n'est déclenchée qu'en présence d'une drogue, le RU486, qui est rapidement assimilée par l'organisme lorsqu'elle est ingérée. Cette drogue étant naturellement absente de l'organisme, l'arrêt de la synthèse de *tequila* ne se produit que lorsque l'on fait absorber cette substance aux mutants.

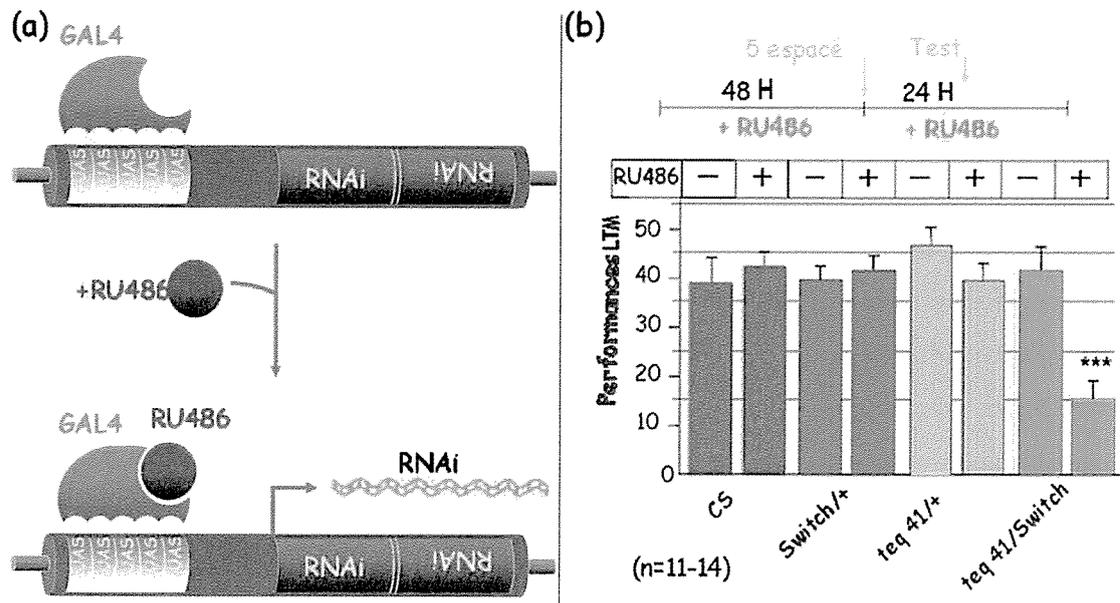


FIG. 76 – Étude de l'influence de tequila sur la mémorisation à long terme (LTM). (a) présente le principe de l'inhibition de la synthèse de la protéine tequila grâce à l'insertion dans le code génétique des individus d'une séquence codant pour la protéine Gal4 et d'une autre codant pour un ARN inhibiteur (RNAi) synthétisé lorsque l'individu ingurgite une dose suffisante de RU486 en présence de Gal4. L'obtention de la souche *RNAi teq 41/Switch* résulte de mutations, l'une permettant aux cellules de synthétiser du Gal4 (lignée *Switch/+*), l'autre correspondant à l'insertion de la séquence ARNi dans le code génétique des individus *RNAi teq 41/+*. L'histogramme (b) présente les performances de mémorisation à long terme obtenues pour les différentes souches, lorsque les mouches étudiées ingurgitent du RU486 pendant toute la durée des tests (pas de synthèse de tequila pour la souche *RNAi teq 41/Switch*).

Les mêmes expériences que celles réalisées sur cette souche ont été comparées avec d'autres effectuées sur des mouches sauvages *CS*, sur une lignée *Switch/+* ayant subi uniquement la mutation permettant de synthétiser le gal4 sous sa forme RU486 dépendante et enfin sur une lignée *teq41/+* ayant subi uniquement l'insertion de la séquence codant pour l'ARN inhibiteur, sans aucun promoteur de transcription. Les résultats présentés sur l'histogramme (b) de la Figure 76 permettent de vérifier que *tequila* joue bien un rôle crucial dans la mémorisation à long terme. Ces derniers montrent, d'une part, que les mutations successives qui conduisent à la souche *RNAi teq 41/Switch* n'entraînent aucun dysfonctionnement susceptible d'altérer les capacités de mémorisation des individus et, d'autre part, prouve que, lorsque l'on bloque la synthèse du gène *tequila* grâce au RU486+, la mémorisation à long terme est très fortement perturbée alors que ces mutants présentent les mêmes performances de mémorisation à long terme que les individus natifs en absence de la drogue. Ces expériences confirment l'hypothèse du rôle fonctionnel du gène *tequila*.

Ainsi, nous avons été à même de prouver l'efficacité de notre technique de FISH, en détectant un gène mis en cause dans une pathologie de retard mental, spécifiquement dans les cellules impliquées et en mesurant les variations d'expression de ce dernier. Nous avons également obtenu, lors de ces expériences, un bon rapport signal sur bruit nous permettant de différencier, même un faible niveau d'expression indétectable par immunohistochimie (cf. Figures 74 (c), (e) et (f)). Toutefois, pour appliquer notre technique à la mesure des variations d'expression de gènes très faiblement exprimés, il semble nécessaire de mettre au point une technique plus sensible, comme par exemple la détection de sondes uniques.

## 12 Vers la détection de sondes uniques

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré la validité de notre technique pour étudier un gène présentant un niveau d'expression assez important. Cependant, nous avons également constaté les limites de notre technique pour la mesure des faibles niveaux d'expression. En effet, l'autofluorescence et la présence de fragments de sondes constitue un bruit de fond difficile à évaluer dans les conditions présentées précédemment qui dégrade le rapport signal sur bruit. Toutefois, ce signal de fond se caractérise par une répartition plus uniforme et une intensité plus faible que celle d'une sonde unique. Pour un gène faiblement exprimé,

et donc un nombre d'ARN limité, les sondes isolées les unes des autres vont émettre chacune un signal localisé et plus intense que le fond. Dans ce cas, si le signal d'une sonde unique est suffisant pour sortir du fond, en dépit du faible niveau de marquage, alors il est possible de les détecter individuellement par une approche de type molécule unique et la quantification est nettement facilitée. Le résultat ne peut être que binaire : si je détecte ponctuellement un signal qui sort du fond, alors il y a une sonde à cet endroit, si je ne détecte aucun signal alors c'est qu'il n'y en a pas ! L'intérêt de travailler en régime d'objet unique prend alors tout son sens. De plus, dans le cas d'une détection binaire, la nécessité d'un éclairage présentant une répartition d'intensité uniforme au centre et en bord de champ devient beaucoup moins critique. Nous nous sommes intéressés à l'amélioration du caractère quantitatif de notre détection afin de pouvoir détecter individuellement les sondes. La première étape dans notre démarche a été de vérifier la possibilité de détecter des sondes uniques en solution. Ensuite nous avons travaillé sur l'optimisation de la résolution de nos images afin de les détecter dans le réseau neuronal des drosophiles.

## 12.1 Détection de sondes ARN uniques en solution

Afin de vérifier que la résolution et la sensibilité de notre microscope sont suffisantes pour envisager le comptage des sondes dans les cellules du cerveau des drosophiles, nous avons, en premier lieu, souhaité visualiser des sondes uniques en solution. Pour ce faire, nous avons réalisé des échantillons en diluant la solution mère de sondes à  $c/100$  dans du glycérol (indice de réfraction  $n = 1,47$  à  $20^{\circ}C$ ), afin de limiter les aberrations. Nous avons ensuite imagé ces échantillons avec l'objectif  $40\times$ ,  $NA = 1,3$ , qui présente la plus grande ouverture numérique et qui est donc susceptible de nous procurer la meilleure résolution. La figure 77 présente le type d'images de ribosondes ARN-Cy5 ciblées sur le gène de la GFP que nous avons obtenues, chacune comportant théoriquement une dizaine molécules de Cy5. En mesurant statistiquement l'intensité des pixels lumineux par rapport au fond comme présenté sur la figure 78, nous avons identifié les signaux des sondes uniques. En moyenne, le rapport signal utile sur fond est de 2,3 pour un écart l'écart type de 0,4. On notera que le fond résulte en partie du signal provenant des sondes situées dans les plans hors focus. L'écart observé peut être imputé aux variations du nombre de molécules de Cy5 présentes sur chaque sonde.

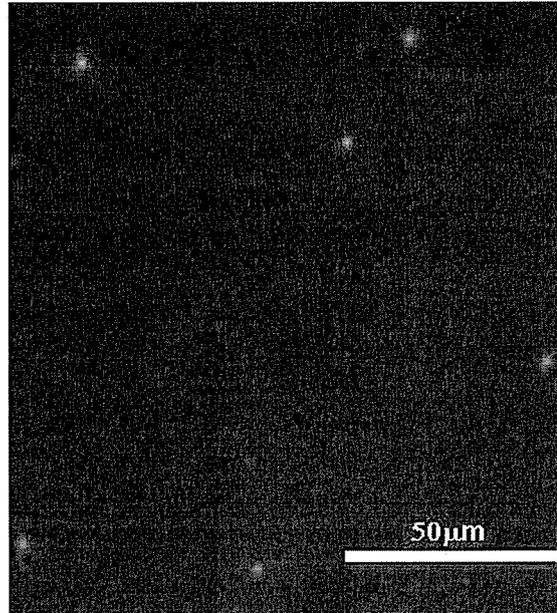


FIG. 77 – Image de sondes ARN uniques en solution.

Image acquise avec l'objectif  $40\times$ ,  $NA = 1,3$  et un temps d'exposition d'une seconde.

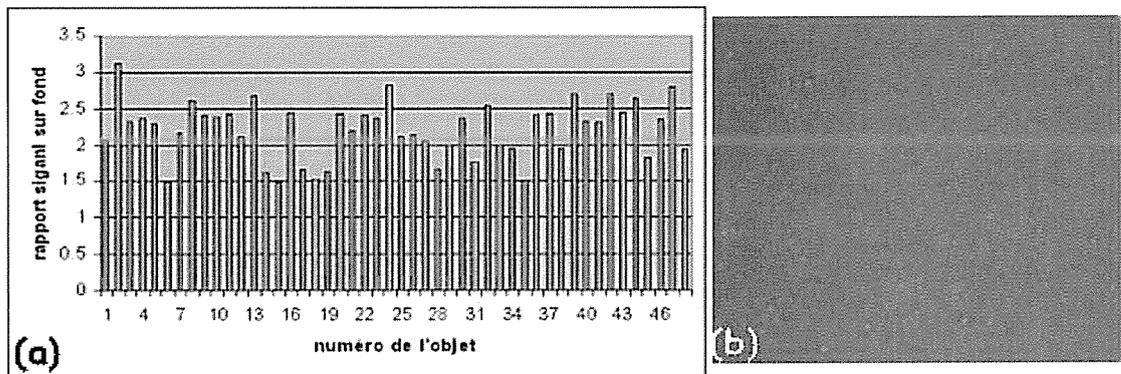


FIG. 78 – Statistique d'intensité des pixels lumineux.

Le graphique (a) présente la répartition du rapport signal utile sur signal de fond, mesurée sur une population de sondes sélectionnées par seuillage. (b) correspond à l'image seuillée dont sont extraites les données présentées sur l'histogramme (a). Sur celle-ci, chaque point orange correspond à un objet pris en compte pour l'étude statistique.

Nous avons également constaté la présence d'agrégats de sondes les plus petits d'entre eux présentant un niveau de signal compatible avec la présence de deux sondes comme l'objet 2 sur le graphique (a) de la figure 78. Par ailleurs, on note la présence de points de très faible intensité sortant du fond. Les ribosondes étant très fragiles, ces derniers correspondent probablement à de petits fragments de sondes cassées ou bien encore à des molécules de Cy5 détachées.

## 12.2 Détection des sondes dans les tissus biologiques

La détection des sondes uniques en solution, nous a logiquement conduits à mettre en œuvre des expériences de détection de sondes dans les tissus marqués de cerveau de drosophile. Pour les besoins de cette expérience, nous avons de nouveau travaillé sur la souche *GFP-Gal4* qui nous avait permis de démontrer la spécificité de notre méthode d'hybridation-in-situ.

En travaillant avec un objectif de plus grande ouverture numérique, qui confère au système une meilleure résolution spatiale (axiale et latérale), nous avons fait l'acquisition de piles d'images prises en déplaçant l'objectif le long de l'axe optique chaque image correspondant donc à un plan de focalisation donné dans l'échantillon. Pour désigner cette technique d'imagerie plan par plan visant à explorer les échantillons dans leur volume, j'emploierai par la suite le terme de séquençage optique. Ainsi, nous avons pu détecter les sondes situés à différentes profondeurs dans nos échantillons (cf. Figures 79 et 80). Nous avons également vérifié que les sondes pénétraient bien dans les tissus hybridés et avons constaté que, dans les cellules marquées, les ARNs détectés étaient bien situés dans la région périnucléaire de la cellule. On notera par ailleurs que, plus les images sont prises profondément dans les tissus, moins le signal des sondes est intense. Cette perte d'intensité et de netteté peut être imputée à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, la rétrodiffusion de l'excitation par le milieu biologique va tendre à faire baisser l'intensité excitatrice reçue par les fluorophores. Puis, l'émission, déjà affaiblie par la baisse de l'excitation, va subir ce même processus de rétrodiffusion, limitant ainsi la collection, alors que le fond, maintenant dû aux premiers plans de l'échantillon plus éclairés, est plus important que celui provenant des plans plus profonds de l'échantillon. De plus, lorsque l'on s'enfonce dans l'échantillon, la diffusion du tissu dégrade légèrement l'imagerie, chaque sonde donne une tache de plus en plus large et de moindre intensité. Afin

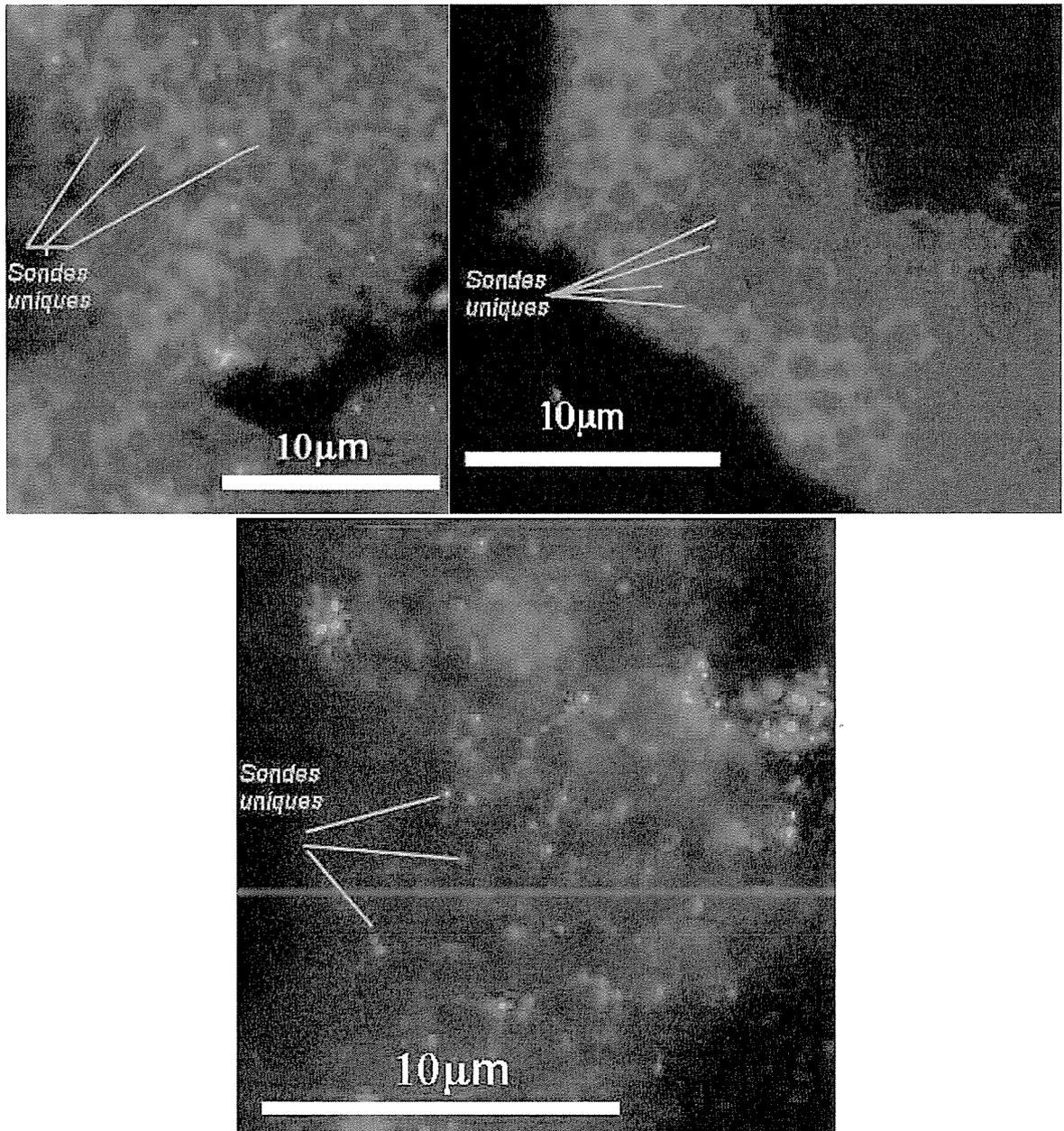


FIG. 79 – Visualisation des sondes dans les tissus marqués.  
Images extraites de piles d'images réalisées sur des drosophiles de la lignée *GFP-Gal4*, avec l'objectif 40×,  $NA = 1,3$  et un temps d'exposition de 0,3 secondes

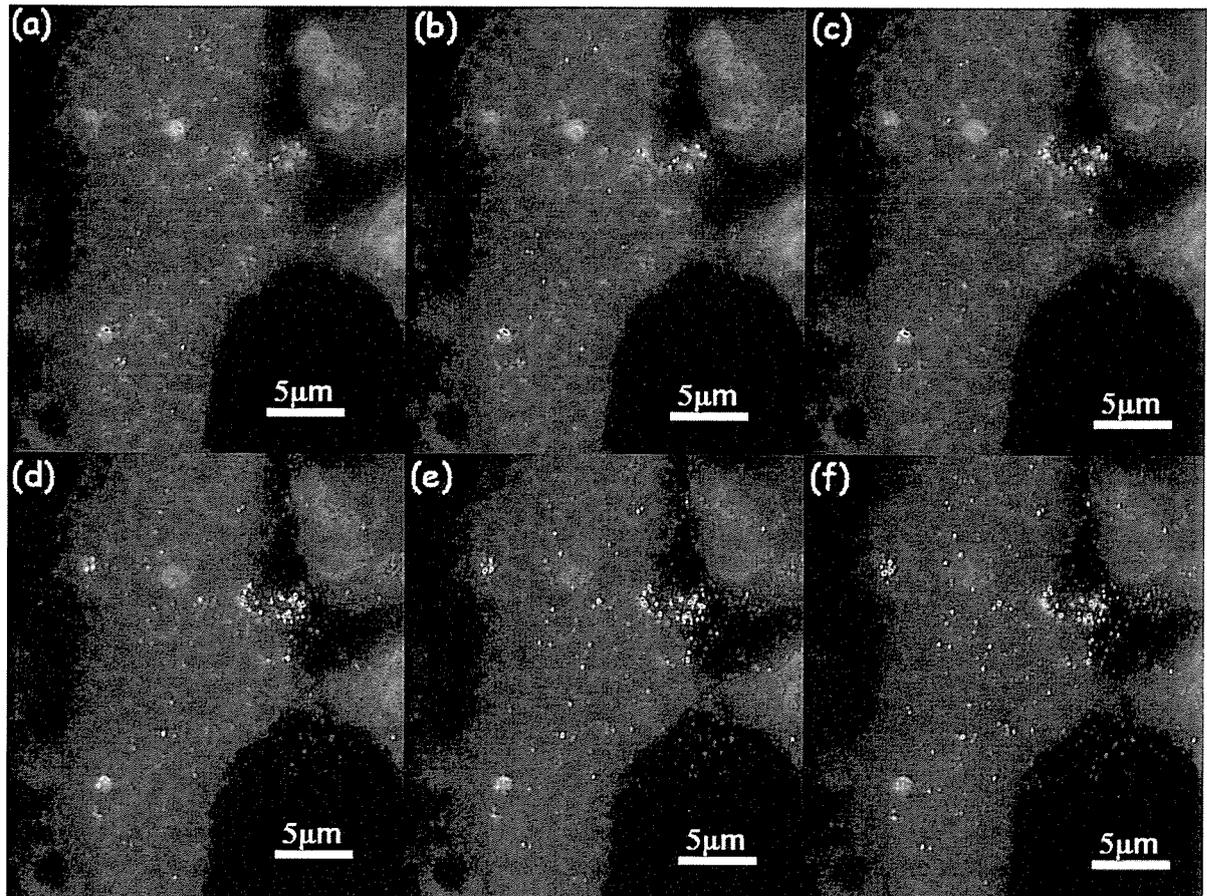


FIG. 80 – Visualisation des sondes dans différents plans de l'échantillon. Images extraites d'une pile réalisée sur une coupe de drosophile de la lignée *GFP-Gal4*, avec l'objectif  $40\times$ ,  $NA = 1,3$  et un temps d'exposition de 0,3 secondes/images. Celles-ci ont été prises à différentes profondeurs dans l'échantillon. Elles sont séparées de  $0,4 \mu\text{m}$ . L'image (a) correspond à la focalisation la plus profonde dans l'échantillon et l'image (f) à la focalisation la plus près de la lamelle.

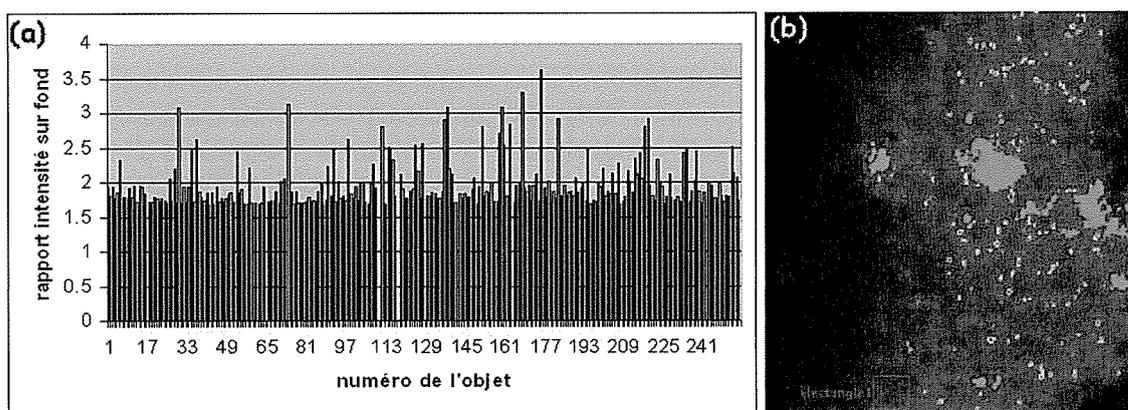


FIG. 81 – Statistique d'intensité des pixels lumineux dans un tissu biologique.

Le graphique (a) présente la répartition du rapport signal utile sur signal de fond, sur une population de sondes sélectionnées par seuillage. (b) correspond à l'image seuillée dont sont extraites les données présentées sur l'histogramme (a). Sur celle-ci, chaque point vert encadré de blanc correspond à un objet, les taches oranges correspondent aux objets seuillés, mais rejetés pour des critères de taille et le carré en bas à gauche représente la zone dans laquelle nous avons mesuré le fond résultant de l'autofluorescence et des plans hors focus.

de limiter les phénomènes de diffusion liés en partie aux différences d'indice dans les tissus, nous avons très récemment appliqué un traitement supplémentaire aux coupes de cerveaux. Celui-ci consiste à remplacer l'eau contenue dans les tissus ( $n = 1,33$ ) par du TDE [144], un milieu de montage d'indice ( $n = 1,515$ ) plus proche de celui des membranes ( $n = 1,48$ ), du milieu de montage final (Dakocytomation fluorescent mounting medium,  $n = 1,5$ ) et de celui de l'huile à immersion et des lamelles ( $n = 1,515$ ). Ceci permet donc, d'une part, de diminuer la diffusion provoquée par les gradients d'indice dans les tissus et, d'autre part, de minimiser l'aberration sphérique qui tend à détériorer la résolution du système.

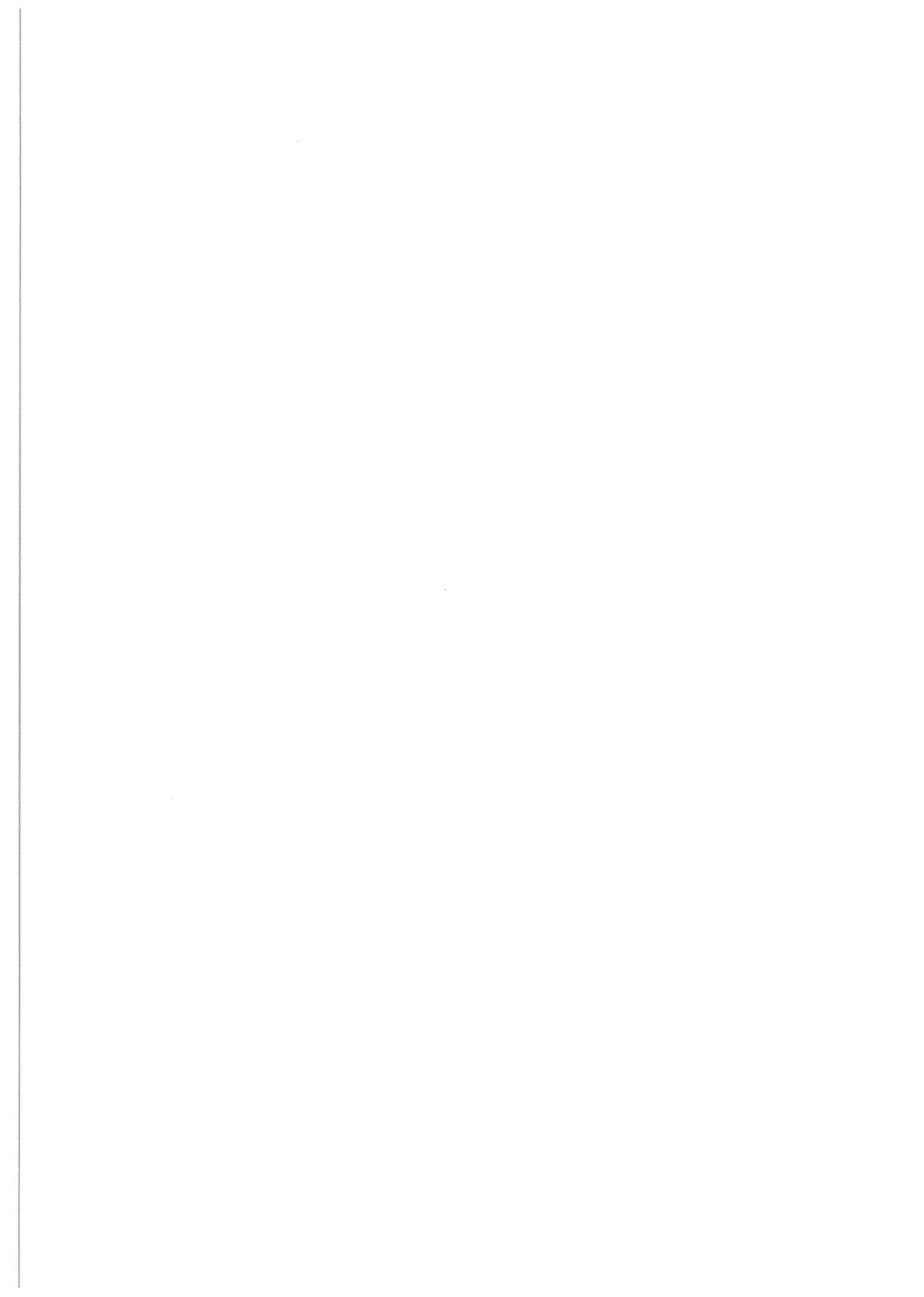
Pour vérifier la présence de sondes uniques, nous avons procédé comme pour les images de sondes en solution. L'étude statistique des sondes sélectionnées par seuillage en intensité et en taille, présentée à la figure 81, nous a permis de remonter à un rapport moyen signal utile sur fond égal à 2 avec un écart type de 0,3. On notera que le fond mesuré dans la zone représentée par le carré sur la figure 81 (b) résulte de la somme des signaux provenant des plans hors focus et du signal d'autofluorescence. Les résultats de cette mesure semblent bien en accord avec ceux obtenus sur les sondes en solution. On peut également détecter la présence de petits agrégats de sondes et donc probablement d'ARN, correspondant aux points présentant un

rapport signal sur fond d'environ trois, se distinguant nettement du niveau moyen comme le montre la figure 81 (a).

Ces deux études ont prouvé la faisabilité de la détection de sondes uniques dans des tissus biologiques aussi complexes que le réseau neuronal du cerveau des drosophiles. Toutefois, l'objectif de quantification semble difficile à atteindre sur de telles piles d'images, du fait du faible contraste lorsque l'on pénètre à l'intérieur des coupes. De ce fait, nous nous intéressons à présent à la possibilité d'appliquer un traitement post-acquisition à nos piles d'images afin d'éliminer au maximum le flou dû à la contribution des plans hors focus et donc d'améliorer le contraste et le rapport signal sur bruit. Nous avons donc fait l'acquisition du module de déconvolution du logiciel Metamorph. En utilisant la déconvolution, nous espérons pouvoir, pour chacune des images de nos piles, retirer la contribution des plans adjacents. Le retrait efficace du flou inhérent à ce phénomène nous permettrait ainsi de mieux résoudre les sondes, même celles situées dans les couches les plus profondes de l'échantillon et donc de pouvoir les compter.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 9.3.3 de ce chapitre, la réponse impulsionnelle (PSF) du système, utilisée en déconvolution, peut être obtenue expérimentalement, en imageant des objets assimilables à des objets ponctuels, tels que des billes fluorescentes de dimension inférieure à la résolution du système. Nous avons commencé à travailler sur la correction des aberrations de notre système afin d'obtenir une PSF identique sur tout le champ imagé. Cependant, ces travaux doivent être poursuivis avant de pouvoir commencer à déconvoluer nos images. En effet, la correction des aberrations du système optique implique, d'une part, une étude plus poussée de l'adaptation des différents indices de réfraction, que nous venons d'entamer et, d'autre part, l'utilisation d'un objectif aplanétique de grande ouverture numérique dont nous devons encore faire l'acquisition, notre objectif de grande ouverture numérique n'étant pas corrigé de la courbure de champ.







## Cinquième partie

# Conclusions et perspectives

Mes travaux de thèse ont, en grande partie, été consacrés au développement et à l'optimisation de systèmes optiques visant à permettre la détection de nano-objets individuels, tels que des sondes calciques et des ribosondes. Afin d'obtenir les résultats initialement visés, nous avons tiré parti des nombreux avantages inhérents à la détection de la molécule unique. Celle-ci offre, entre autre, la possibilité d'accéder aux paramètres temporels d'une dynamique chimique rapide, sans nécessairement mettre le système hors d'équilibre, et constitue un moyen de quantifier le nombre de reporteur d'un phénomène biologique. Ainsi, nous avons pu mettre au point des outils d'investigation qui nous ont permis, directement ou indirectement, de caractériser finement des systèmes d'intérêts biologiques encore mal connus.

La première expérience présentée dans ce manuscrit fut motivée par les besoins croissants dans divers domaines de la biologie, de disposer de sondes fluorescentes dont les propriétés, en terme de sensibilité et de rapidité de réponse sont bien identifiées. Nous avons, dans le but de répondre à cette attente, réalisé un montage de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Bien que délicate à mettre en oeuvre à l'échelle de la molécule unique, la FCS présente de nombreux avantages, comme la possibilité de mesurer les paramètres de diffusion ou la dynamique réactionnelle des molécules étudiées, *in vitro* comme *in vivo*. Elle est très sensible aux diverses sources de bruit qu'il a donc fallu identifier et limiter. Afin de vérifier la validité d'une telle technique pour la caractérisation de sondes ioniques, nous l'avons appliquée à l'étude *in vitro* de la dynamique chimique d'une sonde calcique rapide présentant un intérêt particulier pour l'étude de la signalisation calcique : l'Oregon Green Bapta 5N.

Le système de FCS que nous avons monté fonctionne avec une double excitation mono et biphotonique. Après optimisation du système et de la composition des échantillons (contrôle de la concentration calcique, étude de l'influence des différents constituants de la solution sur la réponse de la sonde), nous sommes parvenus à un compromis entre niveau de signal et préservation des propriétés de fluorescence de la sonde étudiée. Dès lors, nous avons été

à même, en utilisant une excitation à un photon, de mesurer les paramètres temporels de la dynamique chimique de l'OrgBapta5N. Nous avons pu vérifier la cohérence de nos conclusions en comparant les résultats obtenus en FCS avec ceux précédemment publiés dans la littérature, obtenus, *in vitro*, par d'autres techniques.

Les avantages de la microscopie biphotonique étant nombreux (volume focal mieux défini, élimination du bruit facilitée par l'écart spectral important entre excitation et émission, ...) et la technique particulièrement bien adaptée aux études *in vivo* (faible absorption par les tissus vivants, possibilité de travailler avec des échantillons épais), nous avons repris la démarche développée pour l'expérience à un photon pour l'étendre à une excitation biphotonique. La sonde que nous avons utilisée présentant une très faible efficacité de fluorescence lorsqu'excitée à deux photons, nous n'avons pu mener à bout la caractérisation de l'orgBapta5N avec une excitation biphotonique. Toutefois, en détectant la signature de la complexation du calcium par la sonde sur nos courbes d'autocorrélation, nous avons validé la possibilité d'utiliser la technique de FCS biphotonique afin de caractériser temporellement la réponse d'une sonde ionique optimisée pour une excitation à deux photons.

Ces expériences de FCS pourraient ouvrir la voie à des études similaires *in vivo*, néanmoins, il est, avant tout, indispensable de réduire les temps d'acquisition pour le moment incompatibles avec une expérience en tissus vivants. En particulier, procéder à une correction plus poussée des toutes les sources d'aberration du système et optimiser la réjection du bruit hors focus par un filtrage spatial plus strict, permettrait d'améliorer encore le rapport signal sur bruit et donc de raccourcir la durée des acquisitions. Alors, sera-t-il temps d'envisager des expériences *in situ*. Mais pour l'heure, l'équipe projette d'utiliser notre dispositif de FCS à la caractérisation à l'échelle de la molécule unique de nanoparticules métalliques fonctionnalisées.

La seconde expérience décrite dans ma thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet d'étude de la mémoire olfactive de la drosophile qui constitue un modèle animal intéressant de par la relative simplicité de son réseau neuronal et les nombreuses similitudes de son génome avec celui de l'homme. Pour les besoins de cette expérience, j'ai été amenée à travailler sur deux fronts. Je me suis, d'une part, intéressée à la mise au point d'une technique d'hybridation-

in-situ de fluorescence (FISH) fonctionnant pour la première fois dans les tissus neuronaux des drosophiles adultes. D'autre part, j'ai développé un système optique d'imagerie grand champ, optimisé pour la détection d'objets individuels faiblement fluorescents, visant à cartographier et à quantifier l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes d'instauration de la mémoire olfactive.

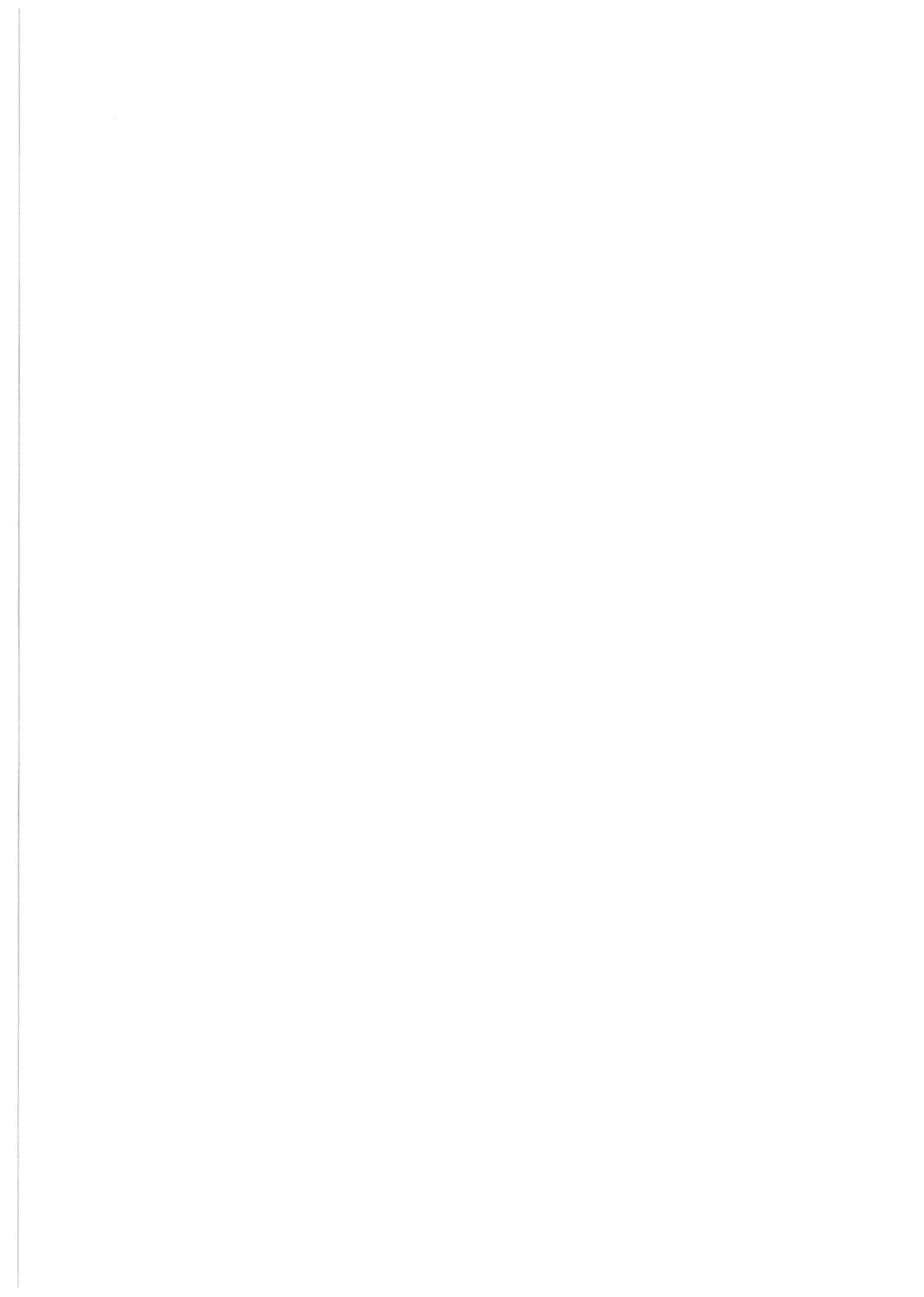
La mise au point d'un protocole d'hybridation-in-situ étant complexe et le nombre de paramètres expérimentaux étant important (température, durée des différentes étapes, salinité, composition des solutions et bains successifs, ...), il nous a fallu aborder le problème par une approche progressive et rigoureuse. Ainsi, en testant pas à pas l'influence des multiples paramètres, nous avons pu proposer plusieurs options, chacune s'appuyant sur un certain nombre de compromis entre qualité des tissus, spécificité du marquage et pénétration des sondes. En travaillant sur des individus mutants, pour lesquels les zones d'expression du gène ciblé (celui de la GFP) étaient connues, nous sommes parvenus à valider l'efficacité la spécificité et la reproductibilité de nos protocoles d'hybridation, ainsi que la sensibilité de notre système de détection. Néanmoins, bien que déjà fonctionnels, les protocoles que nous avons mis au point doivent encore être optimisés. Les résultats fructueux, obtenus suite aux premières étapes de développement et de test, nous ont conduits à appliquer notre technique de FISH à l'étude d'un gène, *tequila*, supposé jouer un rôle au cours de processus de mémorisation. Nous avons cartographié spécifiquement le signal de fluorescence émis par les ribosondes hybridées, en mesurant semi-quantitativement les variations d'expression du gène grâce à notre système d'imagerie. En recoupant ces résultats avec ceux obtenus par d'autres moyens d'études (immunohistochimie, étude comportementale sur plusieurs populations d'individus mutants ou natifs), nous avons été à même de prouver le rôle fonctionnel du gène *tequila*. Ces expériences nous ont également amenés à constater les limites actuelles du protocole d'hybridation, qui s'est avérée difficilement applicable à la quantification de gènes faiblement exprimés.

Dès lors, nous avons cherché à contourner cette limitation et avons, de ce fait, envisagé l'utilisation d'une technique de détection d'objets individuels beaucoup moins ambiguë lorsqu'il s'agit de quantifier de faibles signaux. Avant de nous lancer dans la détection in vivo de molécules d'ARN uniques, nous avons montré avec succès la possibilité de les détecter en solution. Ces premiers tests concluants ont donc donné lieu à une seconde série d'expériences,

---

dans les tissus cérébraux, visant à détecter et quantifier les sondes ARN uniques marquées par notre protocole de FISH. En imageant des sondes uniques à différentes profondeurs dans les tissus marqués, nous sommes parvenus à prouver l'efficacité et la sensibilité de notre système de détection. Nous avons également démontré la possibilité d'utiliser ce protocole de FISH afin de mesurer de manière quantitative l'expression de gènes faiblement exprimés, en dénombrant le nombre d'ARNs marqués par cellule. Cependant, la diffusion des tissus reste encore un paramètre critique qui détériore la fiabilité d'une telle mesure au fur et à mesure que l'on observe des objets localisés profondément dans les tissus. Pour limiter la diffusion, nous avons débuté des travaux d'optimisation de la préparation des échantillons et d'amélioration des performances du système d'imagerie par une correction des aberrations optiques. Ainsi, nous espérons, dans un futur proche, pouvoir diminuer l'effet de flou inhérent la microscopie grand champ par application d'un algorithme de déconvolution aux images après acquisition. Dès lors, il sera possible, sur tous les plans de nos échantillons, de réellement quantifier le nombre de brins d'ARNs marqués, mêmes pour de faibles niveaux d'expression.

À plus long terme, nous espérons mettre au point protocole d'hybridation-in-situ applicable sur des cerveaux entiers (in-toto), et ainsi éliminer tous les problèmes liés à l'étape de découpage. L'imagerie des cerveaux, dont la taille exclut l'utilisation de la microscopie grand champ, demandera alors l'utilisation d'un système de microscopie biphotonique optimisé pour la détection de sondes uniques.



Les solutions du système A1-3 vérifient :

$$\begin{aligned} [OrgCa]_{eq} &= \frac{A \pm \sqrt{[A^2 - 4[Org]_{init}([Ca^{2+}]_{init} - [EDTACa]_{eq})]}}{2} \\ [EDTACa]_{eq} &= \frac{B \pm \sqrt{[B^2 - 4[EDTA]_{init}([Ca^{2+}]_{init} - [OrgCa]_{eq})]}}{2} \end{aligned} \quad (A1-5)$$

Avec  $A = [Org]_{init} + [Ca^{2+}]_{init} + Kd_{Org} - [EDTACa]_{eq}$  et  $B = [EDTA]_{init} + [Ca^{2+}]_{init} + Kd_{EDTA} - [OrgCa]_{eq}$

Seul le couple de solutions comportant un signe (-) devant les termes en racine carré est physiquement acceptable.

Les solutions telles qu'elles sont écrites sont couplées. Afin de pouvoir remonter aux valeurs des concentrations à l'équilibre, on peut faire quelques simplifications. On négligera d'une part, dans le terme  $A$ , la concentration initiale d'OrgBapta5N,  $[Org]_{init}$  (de l'ordre de quelques nanomolaires), par rapport aux concentrations de calcium initial,  $[Ca^{2+}]_{init}$ , et d'EDTA complexé à l'équilibre,  $[EDTACa]_{eq}$  (de l'ordre de la centaine de micromolaires), et par rapport au  $Kd_{Org}$  (de l'ordre de quelques dizaines de micromolaires). D'autre part, en s'appuyant sur les mêmes arguments, on négligera, dans l'expression de la concentration d'EDTA complexé à l'équilibre,  $[EDTACa]_{eq}$ , la concentration en OrgBapta5N complexé,  $[OrgCa]_{eq}$  (de l'ordre de quelque nanomolaire), par rapport à la concentration initiale en calcium  $[Ca^{2+}]_{init}$  (de l'ordre de la centaine de micromolaires). Ainsi les solutions A1-5 deviennent :

$$\begin{aligned} [OrgCa]_{eq} &= \frac{A \pm \sqrt{[A^2 - 4[Org]_{init}([Ca^{2+}]_{init} - [EDTACa]_{eq})]}}{2} \\ [EDTACa]_{eq} &= \frac{B \pm \sqrt{[B^2 - 4[EDTA]_{init}[Ca^{2+}]_{init}]}}{2} \end{aligned} \quad (A1-6)$$

Avec  $A = [Ca^{2+}]_{init} + Kd_{Org} - [EDTACa]_{eq}$  et  $B = [EDTA]_{init} + [Ca^{2+}]_{init} + Kd_{EDTA} - [OrgCa]_{eq}$

## 14 Annexe 2 : Modèle de saturation

Afin remonter aux paramètres de saturation de la molécule d'OrgBapta5N dans son milieu d'étude, à partir des résultats expérimentaux, nous avons eu recours à deux modèles représentant deux cas limites de comportement des molécules. Le premier, développé dans le corps du manuscrit, vise à décrire le cas d'une molécule dont la polarisation tourne plus rapidement que les processus d'absorption et d'émission de la molécule. Le second, présenté dans cette annexe, modélise le cas de molécules dont la rotation est plus lente que les processus d'absorption-émission en présence. Certes un peu moins probable que le premier, aux vues de la taille de la molécule d'OrgBapta5N que je qualifierais d'intermédiaire, il reste intéressant de tester les deux modèles et de comparer l'adéquation de chacun d'entre eux avec les résultats expérimentaux afin de choisir le plus proche de notre expérience.

Pour définir ce second modèle, les moments dipolaires moléculaires doivent être comparés à la polarisation de l'excitation. Si on considère une polarisation excitatrice, dans le plan de l'échantillon, purement suivant l'axe x du plan radial, et des dipôles dont l'orientation dans l'espace est équiprobablement répartie, on peut modéliser l'émission moyenne, normalisée pour une collection sur  $2\pi$  stéradians, comme suit :

$$S_{emis} \left( \Theta, \frac{I}{I_s} \right) = \int_0^{\frac{\pi}{2}} \left( 1 - \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{2 + \frac{I}{I_s} - \frac{I}{I_s} \cos 2\theta}} S_{emObj} \right) d\theta \quad (\text{A2.1})$$

où  $S_{emObj} = \sin \theta \cdot \frac{1}{2} \left[ 3 + \cos^2 \theta \cdot (-1 + \cos^3 \Theta) - 4 \sin^2 \theta \sin^4 \frac{\Theta}{2} - \cos \Theta \cdot (3 + 2 \sin^2 \theta \sin^4 \frac{\Theta}{2}) \right]$  correspond à la fraction du signal émise dans le demi-espace vers l'objectif.

En tenant compte de la collection l'expression du signal détecté devient :

$$S_{détecté} \left( \frac{I}{I_s} \right) = \int_{-\infty}^{+\infty} dz \cdot S_{emis} \left( \Theta, \frac{I}{I_s} \left( \frac{\omega}{R(z)} \right)^2 \right) \left[ \int_0^{|R(z)-a|} CEF(\rho, z) \rho d\rho + \int_{|R(z)-a|}^{R(z)+a} CEF(\rho, z) \rho d\rho \right] \quad (\text{A2.2})$$

La courbe correspondant à cette expression théorique ainsi que les données expérimentales sont représentées à la figure 82 .

Cette dernière montre que les données expérimentales peuvent être correctement décrites par notre modèle tant que le rapport  $\frac{I}{I_s}$  reste inférieur à 3 mais que, au-delà de cette intensité

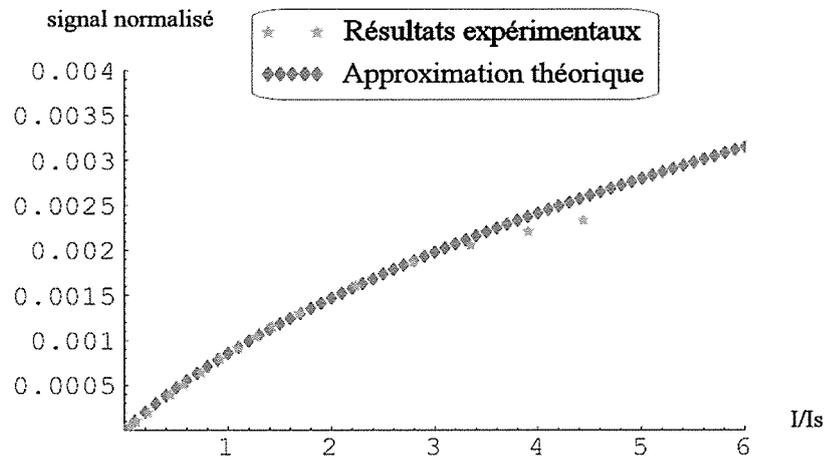


FIG. 82 – Résultat de l'approximation de la courbe de saturation expérimentale par la relation A2.2.

elles augmentent moins rapidement que ce que prédit notre modèle. Là encore on peut penser que ceci traduit l'effet du photoblanchiment.

Ce modèle conduit à une puissance de saturation mesurée sur l'échantillon de  $29,9 \mu W$

## 15 Annexe 3 : Foucaultage

Afin de déterminer les paramètres optiques du montage expérimental, nous avons dans un premier temps, effectué une calibration de la taille du faisceau laser par Foucaultage. Le principe de cette technique est simple, on mesure la répartition d'énergie dans la tache laser en obturant la tache laser avec un couteau de Foucault (une lame) que l'on décale pas à pas après une mesure systématique de la puissance derrière cette lame, et ce jusqu'à ce que la tache entière éclaire la tête du mesureur de puissance. Les résultats que nous avons obtenu par cette mesure sont présentés à la figure 83.

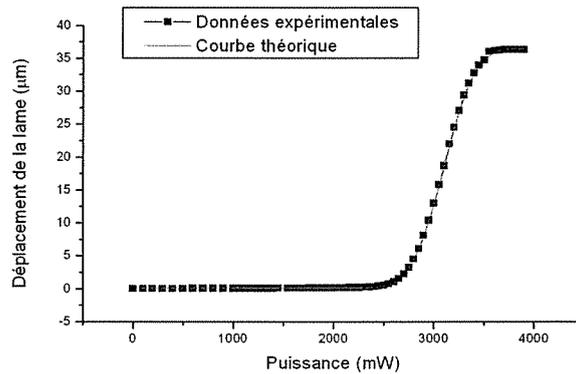


FIG. 83 – Répartition d'énergie au sein de la tache laser obtenue par Foucaultage.

D'un point de vue du formalisme, on décrit le profil d'amplitude gaussien du champ, en puissance comme suit :

$$U(r) = A \cdot \exp\left(-\frac{2r^2}{w^2}\right) \quad (\text{A3-1})$$

La mesure par Foucaultage permet de mesurer la répartition de l'énergie laser. Ainsi la puissance mesurée pour chaque position  $r$  du couteau peut s'exprimer par l'intégrale du profil d'amplitude sur toute la partie de la tache atteignant le détecteur. La puissance,  $P(r)$ , ainsi mesurée, s'écrit :

$$P(r) = A \int_0^x \exp\left(-\frac{2r^2}{w^2}\right) \cdot dr = A \cdot w \sqrt{\frac{\pi}{2}} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{2}r}{w}\right)\right] \quad (\text{A3-2})$$

Avec  $erf(r) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^r \exp(-r^2).dr$ ,  $A$  l'amplitude maximale du signal et  $w$  le waist du faisceau laser.

L'ajustement de la courbe théorique aux résultats expérimentaux, nous permet de déterminer  $w = 349 \pm 1,6\mu m$  et donc d'en déduire la demi largeur du profil d'amplitude à  $\frac{1}{e}$ ,  $r_{1/e}$ , telle que  $U(r_{1/e}) = \frac{A}{e}$  :

$$r_{1/e} = w\sqrt{2} = 496 \pm 1,6\mu m$$

Par la suite, nous prendrons cette valeur de  $r_{1/e}$  comme rayon du faisceau laser en sortie de laser et c'est donc sur celle-ci que nous nous appuierons afin de déterminer les paramètres physiques du montage.

## 16 Annexe 4 : Évolution de la taille du faisceau gaussien à travers la ligne d'excitation

Afin de déterminer l'évolution de la taille du faisceau à travers la ligne d'excitation du microscope nous nous sommes appuyé sur le formalisme des matrices ABCD de transfert en faisceau gaussien.

Nous avons tout d'abord modélisé le télescope. On se placera pour tous les calculs dans l'approximation de lentilles minces :

La traversée d'une lentille se décrit par la matrice suivante :

$$M_L = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_L} & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A4-1})$$

La propagation dans l'air, sur une distance  $d$ , s'écrit :

$$M_d = \begin{pmatrix} 1 & d \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{A4-2})$$

On peut donc écrire la matrice,  $M_{T\text{élescope}}$  de traversée d'un télescope constitué de deux lentilles  $L_1$  et  $L_2$ , séparées d'une distance  $d = f_{L_1} + f_{L_2}$ , somme des focales des deux lentilles :

$$\begin{aligned} M_{T\text{élescope}} &= M_{L_2} \cdot M_{f_1+f_2} \cdot M_{L_1} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_{L_2}} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & f_{L_1} + f_{L_2} \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_{L_1}} & 1 \end{pmatrix} \\ M_{T\text{élescope}} &= \begin{pmatrix} 1 - \frac{f_{L_2} + f_{L_1}}{f_{L_1}} & f_{L_1} + f_{L_2} \\ -\frac{1}{f_{L_2}} - \frac{1}{f_{L_1}} \left(1 - \frac{f_{L_1} + f_{L_2}}{f_{L_2}}\right) & 1 - \frac{f_{L_1} + f_{L_2}}{f_{L_2}} \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (\text{A4-3})$$

Si on considère la taille du faisceau en sortie du laser pour obtenir la matrice décrivant le faisceau sur le diaphragme de champ  $D$ , il est nécessaire de tenir compte de sa propagation sur la distance  $d_0$  entre le laser et la première lentille du télescope, du télescope et de sa propagation sur la distance  $d_1$  entre la lentille  $L_2$  du télescope et le diaphragme de champ.

Dans ce cas, la matrice  $M_D$  décrivant le faisceau sur le diaphragme de champ s'écrit :

$$M_D = M_{d_1} \cdot M_{T\acute{e}lescope} \cdot M_{d_0} = \begin{pmatrix} 1 & d_1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -\frac{f_{L_2}}{f_{L_1}} & f_{L_1} + f_{L_2} \\ 0 & -\frac{f_{L_1}}{f_{L_2}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & d_0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (A4-4)$$

$$M_D = \begin{pmatrix} 1 - \frac{d_1}{f_{L_2}} - \frac{d_1 + (1 - \frac{d_1}{f_{L_2}})(f_{L_1} + f_{L_2})}{f_{L_1}} & d_1 + (1 - \frac{d_1}{f_{L_2}})(f_{L_1} + f_{L_2}) \\ -\frac{1}{f_{L_2}} - \frac{1}{f_{L_1}}(1 - \frac{f_{L_1} + f_{L_2}}{f_{L_2}}) & 1 - \frac{f_{L_1} + f_{L_2}}{f_{L_2}} + d_0 \begin{bmatrix} 1 - \frac{d_1}{f_{L_2}} - \frac{d_1 + (1 - \frac{d_1}{f_{L_2}})(f_{L_1} + f_{L_2})}{f_{L_1}} \\ -\frac{1}{f_{L_2}} - \frac{1 - \frac{f_{L_1} + f_{L_2}}{f_{L_2}}}{f_{L_1}} \end{bmatrix} \end{pmatrix}$$

Afin de calculer les dimensions du faisceau sur ce diaphragme on introduit le rayon de courbure complexe  $q(z)$  du faisceau laser à une distance  $z$  de la sortie de la cavité :

$$\frac{1}{q(z)} = \frac{1}{R(z)} - i \frac{\lambda}{\pi w^2(z)} \quad (A4-5)$$

Avec  $R(z)$  le rayon de courbure physique du faisceau,  $w(z)$  le waist du faisceau à la position  $z$ .

Le rayon de courbure du faisceau au niveau du waist est infini, si l'on considère que le waist se trouve à la sortie de la cavité laser ( $z = 0$ ), on obtient l'expression simplifiée du rayon de courbure complexe en sortie de cavité :

$$q(z = 0) = i \frac{\pi w_0^2}{\lambda} = iz_R \quad (A4-6)$$

Où  $w_0 = w(z = 0)$  et  $z_R$  est la distance de Rayleigh telle qu'à la distance  $z = z_R$ ,  $w(z_R) = \sqrt{2}w_0$ . Cette distance définit la séparation entre le champ proche et le champ lointain. On notera également qu'à la distance  $z = z_R$ , le rayon de courbure  $R$  passe par un minimum,  $R(z_R) = 2z_R$ .

Suite à une la traversée d'un élément défini par la matrice  $M = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix}$ , on peut montrer que  $q$  devient  $q'$  tel que :

$$q' = \frac{Aq + B}{Cq + D} \quad (A4-7)$$

Si on considère le trajet de notre faisceau de la sortie de la cavité jusqu'au diaphragme,

on peut calculer l'expression de  $q'_D$  sur le diffuseur, en utilisant la matrice  $M_D$  (cf.A4-4). Les expressions calculées sous Mathematica ne seront pas présentées dans cette annexe.

En s'appuyant sur l'équation A4-5, on peut, à partir du résultat obtenu pour  $q'_D$ , remonter au rayon de courbure réel  $R'(z')$  et au waist du faisceau  $w'(z')$  au niveau du diaphragme de champ :

$$\begin{aligned} R'(z') &= \frac{1}{\text{Re}[\frac{1}{q'_D}]} \\ w'^2(z') &= -\frac{\lambda}{\pi} \text{Im}[\frac{1}{q'_D}] \end{aligned} \quad (\text{A4-8})$$

Toutefois, afin de se conformer au formalisme utilisé pour calculer la taille du faisceau laser en sortie de cavité, nous allons effectuer les changements de variable suivant  $r_{1/e'}(z') = \sqrt{2}w'(z')$  et  $r_{1/e} = \sqrt{2}w_0$ . Les termes  $r_{1/e'}(z')$  et  $r_{1/e}$  correspondent respectivement aux rayons du faisceau à  $\frac{1}{e}$  du maximum de l'amplitude du signal en puissance, sur le diaphragme et en sortie de cavité laser. Ainsi, on peut faire l'application numérique pour les valeurs suivantes :  $d_0 = 1050mm$ ,  $d_1 = 110mm$ ,  $r_{1/e} = 0,496mm$  et  $f_{L_1} = 8.55mm$  en faisant varier la valeur de  $f_{L_2}$  et donc le grandissement  $G_T$  du télescope :

$f_{L_2}$	100	120	150	170	190	200
$G_T$	11.7	14	17.5	19.9	22.2	23.4
$r_{1/e'}$	9.6	11.5	14.4	16.3	18.2	19.2

Tab A.1 : Evolution de la taille du faisceau sur D

Afin d'être plus rigoureux, on peut tenir compte du diffuseur tournant situé en sortie du télescope à une distance  $d_{1a} = 60mm$  de  $L_2$  et à une distance  $d_{1b} = 50mm$  du diaphragme. Ce diffuseur dont le diamètre est de  $\phi = 50mm$  et qui introduit une divergence est de  $\theta = 1^\circ$  peut, selon le constructeur (Physical Optics Corporation), être assimilé à une lentille divergente de focale  $f_{D:iff} = \frac{\phi}{2 \tan \theta}$ . On peut donc refaire le calcul de la matrice de transfert du système

entier,  $M_D^{diff}$ , en introduisant la matrice de transfert du diffuseur :

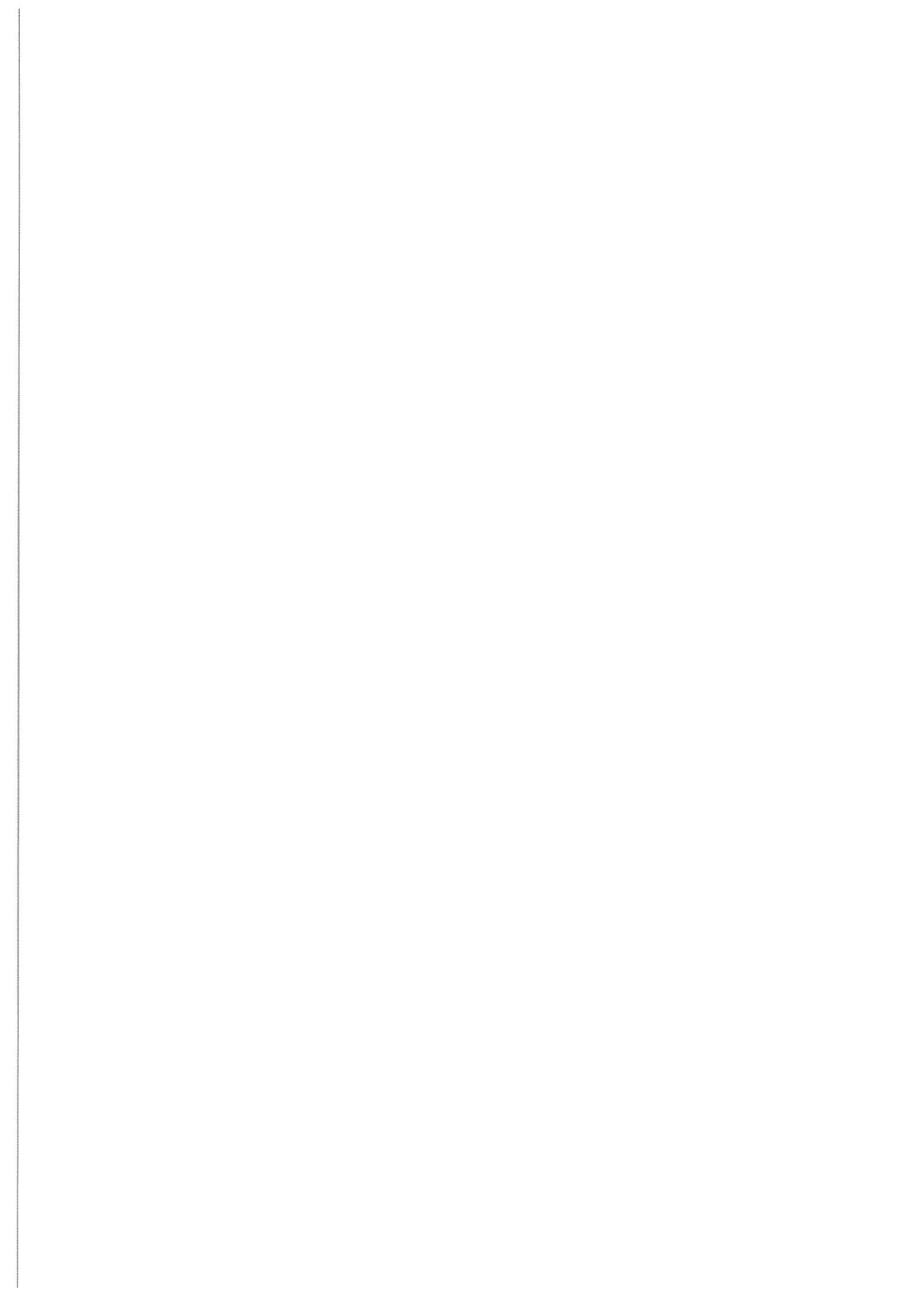
$$M_{Diff} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f_{Diff}} & 1 \end{pmatrix}$$

$$M_D^{diff} = M_{d_{1b}} \cdot M_{Diff} \cdot M_{d_{1a}} \cdot M_{T\acute{e}lescope} \cdot M_{d_0} \quad (A4-9)$$

Et en procédant exactement comme dans le cas précédent on peut calculer  $r_{1/e}^{diff}(z)$  :

$f_{L_2}$	100	120	150	170	190	200
$G_T$	11.7	14	17.5	19.9	22.2	23.4
$r_{1/e}^{diff}$	9.9	11.9	14.9	16.9	18.8	19.8

Tab A.2 : Evolution de la taille du faisceau sur D en présence du diffuseur





## Références

- [1] K. M. Berland A. Nagy, J. Wu. Characterizing observation volumes and the role of excitation saturation in one-photon fluorescence fluctuation spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 10(4) :044015, 2005.
- [2] M. D. Adams and al. The genome sequence of drosophila melanogaste. *Science*, 287 :2185–2195, 2000.
- [3] M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb. Two-photon fluorescence excitation cross section of biomolecular probes from 690 to 960. *Appl. Opt.*, 37(31) :7352–7356, 1998.
- [4] S.R. Aragon and R. Pecora. Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.*, 64 :1791–1803, 1976.
- [5] J. M. Artigas, A. Felipe, and M. J. Buades. Contraste sensitivity of the visual system in speckle imagery. *JOSA A*, 11(9) :2345–2349, 1994.
- [6] J. Azoulay. *Méthodes spectroscopiques originales pour exploiter les propriétés de sonde locale d'un nanoobjet individuel*. PhD thesis, Université Paris XI, 2001.
- [7] G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of dsred, a red fluorescent protein from coral. *PNAS*, 97 :11984–11989, 2000.
- [8] D. S. Banks and C. Fradin. Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophys. J.*, 89 :2960–2971, 2005.
- [9] T. Basché, W.E. Moerner, M. Orrit, and U.P. Wild. *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. VCH, 1996.
- [10] Th. Basché, W. P. Ambrose, and W.E. Moerner. Optical and kinetics of single impurity molecules in a polymer : spectral diffusion and persistent spectral hole burning. *JOSA B*, 9(5) :829–836, 1992.
- [11] J. G. Bauman, J. Wiegant, P. Borst, and P. van Duijn. A new method for fluorescence microscopical localization of specific dna sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled rna. *Exp. Cell Res.*, 128 :485–490, 1980.
- [12] K. M. Berland. Detection of specific dna sequences using dual-color two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biotechnol.*, 108 :127–136, 2004.

- [13] K. M. Berland and G. Shen. Excitation saturation in two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Appl. Opt.*, 42(27) :5566–5576, 2003.
- [14] K. M. Berland, P. T. C. So, and E. Gratton. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy : Method and application to the intracellular environment. *Biophys. J.*, 68 :694–701, 1995.
- [15] J. Bewersdor, R. Medda, S. Jakobs, and S.W. Hell. 4pi microscopy of quantum dot-labeled cellular structures. *Journal-of-Structural-Biology*, 156(3) :5175–23, 2006.
- [16] S. Bollanti, P. Di Lazzaro, and D. Murra. More about the light beam shaping by the integration method. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, 28 :179–186, 2004.
- [17] M. J. Booth and T. Wilson. Strategies for the compensation of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy of skin. *J. of Microsc.*, 200(1) :68–74, 2000.
- [18] S. Boulon, E. Basyuk, J.-M. Blanchard, E. Bertrand, and C. Verheggen. Intra-nuclear rna trafficking : insights from live cell imaging. *Biochimie*, 84(8) :805–813, 2002.
- [19] S. Brasselet, E. J. G. Peterman, A. Miyawaki, and W.E. Moerner. Single-molecule fluorescence resonant energy transfer in calcium concentration dependent cameleon. *J. Phys. Chem. B*, 104 :3676–3682, 2000.
- [20] R. Brock, M. A. Hink, and T. M. Jovin. Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence. *Biophys. J.*, 75 :2547–2557, 1998.
- [21] S. Charpak, J. Mertz, E. Beaurepaire, L. Moreaux, and K. Delaney. Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells. *PNAS*, 98 :1230–1234, 2001.
- [22] T.-S. Chen, S.-. Zeng, Q.-M. Luo, Z.-H. Zhang, and W. Zhou. High-order photobleaching of green fluorescent protein inside live cells in two-photon excitation microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291 :1272–1275, 2002.
- [23] T.-S. Chen, S.-Q Zeng, W. Zhou, and Q.-M. Luo. A quantitative theory model of a photobleaching mechanism. *Chin. Phys. Lett*, 20 (11) :1940–1943, 2003.
- [24] X. Chen, P. S. Conti, and R. A. Moats. In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin  $\alpha 3$  in brain tumor xenografts. *Cancer Research*, 64 :8009–8014, 2004.

- [25] S. Chitralakha, K. V. Avudainayagam, and S. V. Pappu. Role of spatial coherence on the rotation sensitivity of laue fringes : an experimental study. *Appl. Opt.*, 28(2) :345–349, 1989.
- [26] S.J. Clarke, C.A. Hollmann, Z.Zhijun, D.Suffern, S.E. Bradforth, N.M. Dimitrijevic, W.G. Minarik, and J.L. Nadeau. Photophysics of dopamine-modified quantum dots and effects on biological systems. *Nature-Materials*, 5(5) :409–417, 2006.
- [27] D. Comas, F. Petit, and T. Preat. Drosophila long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature*, 430(6998) :460–463, 2004.
- [28] D. Courjon and C. Bainier. *Le champ proche optique : Théorie et applications*. Springer, 2001.
- [29] E. V. Craenenbroeck and Y. Engelborghs. Fluorescence correlation spectroscopy : molecular recognition at single molecule level. *J. Mol. Recognit.*, 13 :93–100, 2000.
- [30] M. Cumme, M. Riethmüller, D. Mademann, M. Schrenk, and P. Weissbrodt. Hot spot free diffractive duv-homogenizer for high na-illumination. *Proc. SPIE*, 5757(1) :1529–1536, 2004.
- [31] I. A. Darby and T. D. Hewitson. *In situ hybridization protocols*. Humana Press, 2006.
- [32] J. Boulet de Monvel, S. Le Clavez, and M. Ulfndahl. Image restoration for confocal microscopy : Improving the limits of deconvolution, with application to visualisation of mammalian hearing organ. *Biophys. J.*, 80 :2455–2470, 2001.
- [33] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb. Two photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248 :73–76, 1990.
- [34] G. Didelot, F. Molinari, P. Tchénio, D. Comas, E. Milhiet, A. Munnich, L. Colleaux, and T. Preat. Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in drosophila. *Science*, 313 :851–853, 2006.
- [35] A. Dieterlen, M.P. Gramain, C. Xu, F. Guillemain, and S. Jacquy. Psf identification applied to 3-d fluorescence microscopy quantification. *Proc. SPIE*, 4431 :66–74, 2001.
- [36] D. A. Digregorio and J. L. Vergara. Localized detection of action potential-reduced presynaptic calcium transients at a xenopus neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 505.3 :585–592, 1997.

- [37] P. S. Dittrich, S. P. Schaëfer, and P. Schwille. Characterization of the photoconversion on reaction of the fluorescent protein kaede on the single-molecule level. *Biophys. J.*, 85 :3446–3455, 2005.
- [38] P. S. Dittrich and P. Schwille. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. *Appl. Phys. B*, 73 :829–837, 2001.
- [39] P. S. Dittrich and P. Schwille. Spatial two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy for controlling molecular transport in microfluidic structures. *Anal. Chem.*, 74 :4472–4479, 2002.
- [40] C. Eggeling, A. Volkmer, and C. A. M. Seidel. Molecular photobleaching kinetics of rhodamine 6g by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy. *Chem. Phys. Chem.*, 6 :791–804, 2005.
- [41] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and C. A. M. Seidel. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection : Evidence of two-step photolysis. *Anal. Chem.*, 70 :2651–2659, 1998.
- [42] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, T. Deringer, and U. B. Kaupp. Performance of fluorescent correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration. *Chem. Phys. Chem.*, 6 :2324–2336, 2005.
- [43] B.P. English, W. Min, A.M. Oijen, K.T. Lee, G. Luo, H. Sun, B.J. Cherayil, S.C. Kou, and X.S Xie. Ever fluctuating single enzyme molecules :michaelis-menten equation revisited. *Nature chemical biology*, 2(2) :87–94, 2006.
- [44] L. Erdmann, M. Burkhardt, and R. Burnner. Coherence management for microlens laser beam homogenizers. *Proc. SPIE*, 4775 :145–154, 2002.
- [45] G. C. Faas, K. Karacs, J. L. Vergara, and I. Mody. Kinetic properties of dm-nitrophen binding to calcium and magnesium. *Biophys. J.*, 88 :4421–4433, 2005.
- [46] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, and R. H. Singer. Visualization of single rna transcripts in situ. *Science*, 280 :585–590, 1998.
- [47] C. C. Fu, H. Y. Lee, K. Chen, T. S. Lim, H. Y. Wu, P. K. Lin, P. K. Wei, P. H. Tsao, H. C. Chang, and W. Fann. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *PNAS*, 104(3) :727–32, 2007.

- [48] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida. Imaging of single fluorescent molecules and individual atp turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*, 374(6522) :555–559, 1995.
- [49] A.Cavalier G. Morel. *Hybridation in situ en microscopie photonique*. Polytechnica, 1998.
- [50] J. G. Gall and M.L. Pardue. Formation and detection of rna-dna hybrid molecules in cytological preparations. *PNAS*, 63(2) :378–383, 1969.
- [51] J. G. Gall and M.L. Pardue. Molecular hybridization of radioactive dna to the dna of cytological preparations. *PNAS*, 64 :600–604, 1969.
- [52] N.G. George, C.R. Christensen, J.S. Bennet, and B.D. Guenther. Speckle noise in display. *JOSA*, 66(11) :1282–1290, 1976.
- [53] S. Frisken Gibson and F. Lanni. Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *JOSA A*, 8(10) :1061–1613, 1991.
- [54] J. W. Goodman. *Speckle phenomena in optics : theory and applications*. Roberts & company, 2007.
- [55] I. Gregor, D. Patra, and J. Enderlein. Optical saturation in fluorescence correlation spectroscopy under continuous-wave and pulsed excitation. *ChemPhysChem*, 6 :164–170, 2005.
- [56] Y. V. Griko. Energetics of ca<sup>2+</sup> edta interactions : calorimetric study. *Biophysical Chemistry*, 79 :117–127, 1999.
- [57] Min Gu. *Advanced optical imaging theory*. Springer-Verlag, 2000.
- [58] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. of Microsc.*, 198 :82–87, 2000.
- [59] T. Ha, T. Enderle, D.F. Ogletree, D.S. Chemla, P.R. Selvin, and S. Weiss. Probing the interaction between two single molecules : Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *PNAS*, 93 :6264–6268, 1996.

- [60] O. Haeberlé, F. Bicha, C. Simler, A. Dieterlen, C. Xu, B. Colicchio, S. Jacquy, and M.-P. Gramain. Identification of acquisition parameters from the point spread function of a fluorescence microscope. *Optics Communications*, 196 :109–117, 2001.
- [61] R. P. Haugland. *Excited States of Biopolymers*. Plenum Press, 1983.
- [62] R. P. Haugland. *Handbook for Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes, 1996.
- [63] U. Haupts, S. Maiti, P. Schwille, and W. W. Webb. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *PNAS*, 95 :13573–13578, 1998.
- [64] S. T. Hess and W. W. Webb. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 83 :2300–2317, 2002.
- [65] C.D. Hu and T.K. Kerppola. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.*, 21 :539–545, 2003.
- [66] I. Isabel, A. Pascual, and T. Preat. Exclusive consolidated memory phases in drosophila. *Science*, 304 :104–1027, 2004.
- [67] C. Julien. *Fluorescence et Diffusion Raman exaltée de surfaces (SERS) de molécules individuelles*. PhD thesis, Université Paris XI, 2004.
- [68] Z. Kam, M.O. Jones, H. Chen, D. A. Agard, and J. W. Sedat. Design and construction of an optical illumination system for quantitative wide-field multi-dimensional microscopy. *Bioimaging*, 1 :71–81, 1993.
- [69] J. P. Y. Kao and R. Y. Tsien. Ca<sup>2+</sup> binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurement. *Biophys. J.*, 53 :635–639, 1988.
- [70] S. A. Kim, K. G. Heinze, K. Bacia, M. N. Waxham, and P. Schwille. Two-photon cross-correlation analysis of intracellular reactions with variable stoichiometry. *Biophys. J.*, 88 :4319–4336, 2005.
- [71] S. A. Kim, K. G. Heinze, M. N. Waxham, and P. Schwille. Intracellular calmodulin availability accessed with two-photon cross-correlation. *PNAS*, 101 :105–110, 2004.

- [72] M. Kinjo and R. Rigler. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 23 :1795–1799, 1995.
- [73] D.-S. Ko, M. Sauer, S. Nord, R. Mtiller, and J. Wolfrum. Determination of the diffusion coefficient of dye in solution at single molecule level. *Chem. Phys. Lett.*, 269 :54–58, 1997.
- [74] D. E. Koppel. Statistical accuracy of fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. rev. A*, 10 :1938–1945, 1974.
- [75] A. Kozma and C.R. Christensen. Effect of speckle on resolution. *JOSA*, 66(11) :1257–1260, 1976.
- [76] M. Kozubek. Theoretical versus experimental resolution in optical microscopy. *Microscopy research and technique*, 53 :157–166, 2001.
- [77] O. Krichevsky and G. Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy : the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.*, 65 :251–297, 2002.
- [78] M. Kumbhakar, S. Nath, T. Mukherjee, J. P. Mittal, and H. Pal. Single-molecule detection in exploring nanoenvironments : an overview. *Journal of photochemistry and photobiology C : Photochemistry Reviews*, 5 :113–137, 2004.
- [79] S. C. Lakhotia, T. K. Rajendra, and K. V. Prasanth. Developmental regulation and complex organization of the promoter of the non-coding hsrw gene of drosophila melanogaster. *J. Biosci.*, 26(1) :25–38, 2001.
- [80] J. R. Lakowicz. *Topics in Fluorescence spectroscopy, Volume 5 : Non linear and two-photon-induced fluorescence*. Springer, 2002.
- [81] J. M. Larson. 2-d and 3 d deconvolution of confocal fluorescence images by maximum likelihood estimation. *Prog. Biomed. Opt. Im., Proc. SPIE. vol4621*, 3(13) :86–94, 2002.
- [82] J. M. Levsky and R. H. Singer. Fluorescence in situ hybridization : past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116 :2833–2838, 2003.
- [83] S. Lowenthal and D. Joyeux. Speckle removal by a slowly moving diffuseur associated with a motionless diffuseur. *JOSA*, 61(7) :847–851, 1971.

- [84] P. Erne M. Eberhard. Calcium binding to fluorescent calcium indicators : calcium green, calcium orange and calcium crimson. *Biochem. biophys. res. commun.*, 180(1) :209–215, 1991.
- [85] G. Maertens, J. Vercammen, Z. Debyser, and Y. Engelborghs. Measuring protein-protein interactions inside living cells using single color fluorescent correlation spectroscopy. application to human immunodeficiency virus type 1 integrase and ledgf/p75. *The FASEB J.*, 19 :1039–1041, 2005.
- [86] D. Magde, E Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29 :705–708, 1972.
- [87] D. Magde, E. Elson, and W.W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers.*, 13(1) :29–61, 1974.
- [88] S. Maiti, U. Haupts, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy : Diagnostics for sparse molecules. *PNAS*, 94 :11753–11757, 1997.
- [89] W. Manz, G. Arp, G. Schumman-Kindel, U. Szewzyk, and J. Reitner. Wide field deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveal the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *J. Microbiol. Meth.*, 40 :125–134, 2000.
- [90] S. E. McGuire, M. Deshazer, and R. L. Davis. Thirty years of olfactory learning and memory research in drosophila melanogaster. *Progress in Neurobiology*, 76 :328–347, 2005.
- [91] S. E. McGuire, P. T. Le, and R. L. Davis. The role of drosophila mushroom body signaling in olfactory memory. *Science*, 293 :1330–1333, 2001.
- [92] J. Mertz. Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy. *Eu. Phys. J. D*, 3 :53–66, 1998.
- [93] J. Mertz, C. Xu, and W. W. Webb. Single molecule detection by two-photon excited fluorescence. *Opt. Lett.*, 20 :2532–2534, 1995.
- [94] F-J. Meyer-Almes and M. Auer. Enzyme inhibition assays using fluorescence correlation spectroscopy : A new algorithm for the derivation of  $k_{cat}/K_m$  and  $K_i$  values at substrate

- concentrations much lower than the michaelis constant. *Biochem.*, 39 :13261–13268, 2000.
- [95] E. Milhiet, D. Comas, A. Richard, G. Didelot, A. Débarre, T. Preat, and P. Tchénio. A new in-situ hybridization towards single-rna detection. *J. of Luminescence*, 127 :276–279, 2007.
- [96] E. Milhiet, A. Débarre, P. Tchénio, J. Neveu, D. Comas, and T. Preat. In-situ hybridization and single-molecule detection. *J. Phys. IV*, 135 :151, 2006.
- [97] W. Min, B.P. English, G. Luo, B.J. Cherayil, S.C. Kou, and X.S. Xie. Fluctuating enzymes : Lessons from single-molecule studies. *Acc. Chem. Res.*, 38 :923–93, 2005.
- [98] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. Fluorescent indicators for ca sup 2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645) :882–887, 1997.
- [99] W. E. Moerner. A dozen years of single-molecule spectroscopy in physics, chemistry, and biophysics. *J. Phys. Chem.*, 106 :910–927, 2002.
- [100] W. E. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *review of scientific instruments*, 74 (8) :3593–3618, 2003.
- [101] F. Molinari, M. Rio, V. Meskenaitė, F. Encha-Razavi, J. Auge, D. Bacq, S. Briault, M. Vekemans, A. Munnich, T. Attié-Bitach, P. Sonderegger, and L. Colleaux. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science*, 298 :1779–1781, 2002.
- [102] G. M. Morris, D. R. Raguin, M. Rossa, and M. Emmel. Diffractive optique technology for projection display. *Proc. SPIE*, 2650 :112–119, 1996.
- [103] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. Lewis, and A. S. Waggoner. Cyanine dye labeling reagents : sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem.*, 4(2) :105–111, 1993.
- [104] M. Naraghi. T-jump study of calcium binding kinetics of calcium chelators. *Cell Calcium*, 22(4) :255–268, 1997.
- [105] P.M. Nederlof, D. Robinson, R. Abuknesha, J. Wiegant, A.H.N. Hopman, H.J. Tanke, and A.K. Raap. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry*, 10 :20–27, 1989.

- [106] M. A. A. Neil, R. Juskaitytis, and T. Wilson. Methods of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Opt. Lett.*, 25(22) :1905–1907, 1997.
- [107] M. A. A. Neil, A. Squire, R. Juskaitytis, P. I. H. Bastiaens, and T. Wilson. Wide field optical sectioning fluorescence microscopy with laser illumination. *J. of Microsc.*, 197 :1–4, 2000.
- [108] T. Parasassi, W. Yu, D. Durbin, L. Kuriashkina, E. Gratton, N. Maeda, and F. Ursini. Two-photon microscopy of aorta fibers shows proteolysis induced by ldl hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.*, 98 :1589–1597, 2000.
- [109] A. Pascual and T. Preat. Localization of long-term memory within the drosophila mushroom body. *Science*, 294 :1115–1117, 2001.
- [110] G. H. Patterson and D. W. Piston. Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophys. J.*, 78 :2159–2162, 2000.
- [111] G. H. Patterson, W. D. Sharif, S. R. Kain, and D. W. Piston. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 73 :2782–2790, 1997.
- [112] A. Periasamy, P. Skoglund, C. Noakes, and R. Keller. An evaluation, of two photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in xenopus morphogenèse. *Microsc. Res. Tech.*, 47 :172–181, 1999.
- [113] M. Pluta. *Advanced Light Microscopy, Vol. 2 : Specialized Methods*. Elsevier, 1989.
- [114] K. V. Prasanth, T. K. Rajendra, A. K. Lal, and S. C. Lakhotia. Omega speckles Ū a novel class of nuclear speckles containing hnrnps associated with noncoding hsr-omega rna in drosophila. *Journal of Cell Science*, 113 :3485–3497, 2000.
- [115] T. Preat, J-L. Da Lage, L. Colleaux, G. Didelot, F. Molinari, P. Tchénio, E. Milhiet, A. Munnich, and M-L. Cariou. Response to comment on Ştequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in drosophilaŤ. *Science*, 316 :1698c, 2007.
- [116] H. Qian and E. Elson. Analysis of confocal laser-microscope a optics for 3d fluorescence correlation sepctroscopy. *Appl. Opt.*, 30 :1885–1895, 1991.

- [117] H. Qian, S. Saffarian, and E.L. Elson. Concentration fluctuations in a mesoscopic oscillating chemical reaction system. *PNAS*, 99 :10376–10381, 2002.
- [118] W. G. Quinn, W. A. Harris, and S. Benzer. Conditioned behavior in drosophila melanogaster. *PNAS*, 71 :708–712, 1974.
- [119] T. Pr eat R. Hitier, F. Petit. M emoires de mouche. *Pour la science*, 31 :42–47, 2001.
- [120] A. K. Raap. Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutation Research*, 400 :287–298, 1998.
- [121] C. N. Reilley and R. W. Schmidt. Chelometric titrations with potentiometric end point detection : Mercury as pm indicator electrode. *Anal. Chem.*, 30 :947–953, 1958.
- [122] B. Richards and E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems ii. structure of the image field in an aplanatic system. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 253 :358–379, 1959.
- [123] R. Rigler and E.S. Elson. *Fluorescence correlation spectroscopy : Theory and applications*. Springer, 2001.
- [124] R. Rigler,  . Mets, J. Widengren, and P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background : analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22(3) :169–175, 1993.
- [125] R. Rigler and J. Widengren. *Bioscience*. Lund university Press, 1990.
- [126] R. Rigler and J. Widengren. Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioscience*, 3 :180–183, 1990.
- [127] R. Rudolf, M. Mongillo, R. Rizzuto, and T. Pozzan. looking forward to seeing calcium. *Nature Reviews*, 4 :579–586, 2003.
- [128] Y. Sakoan and T. Yanagida. Single-molecule visualization in cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 :SS1–SS5, 2003.
- [129] B.A. Scalettar, J.R. Swedlow, J.W. Sedat, and D.A. Agard. Dispersion, aberration and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images. *J. of Microsc.*, 182(1) :50–60, 1996.
- [130] L. Schoutteten, P. Denjean, J. Faure, and R. B. Pansu. Photophysics of calcium green 1 in vitro and in live cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1 :2463–2469, 1999.

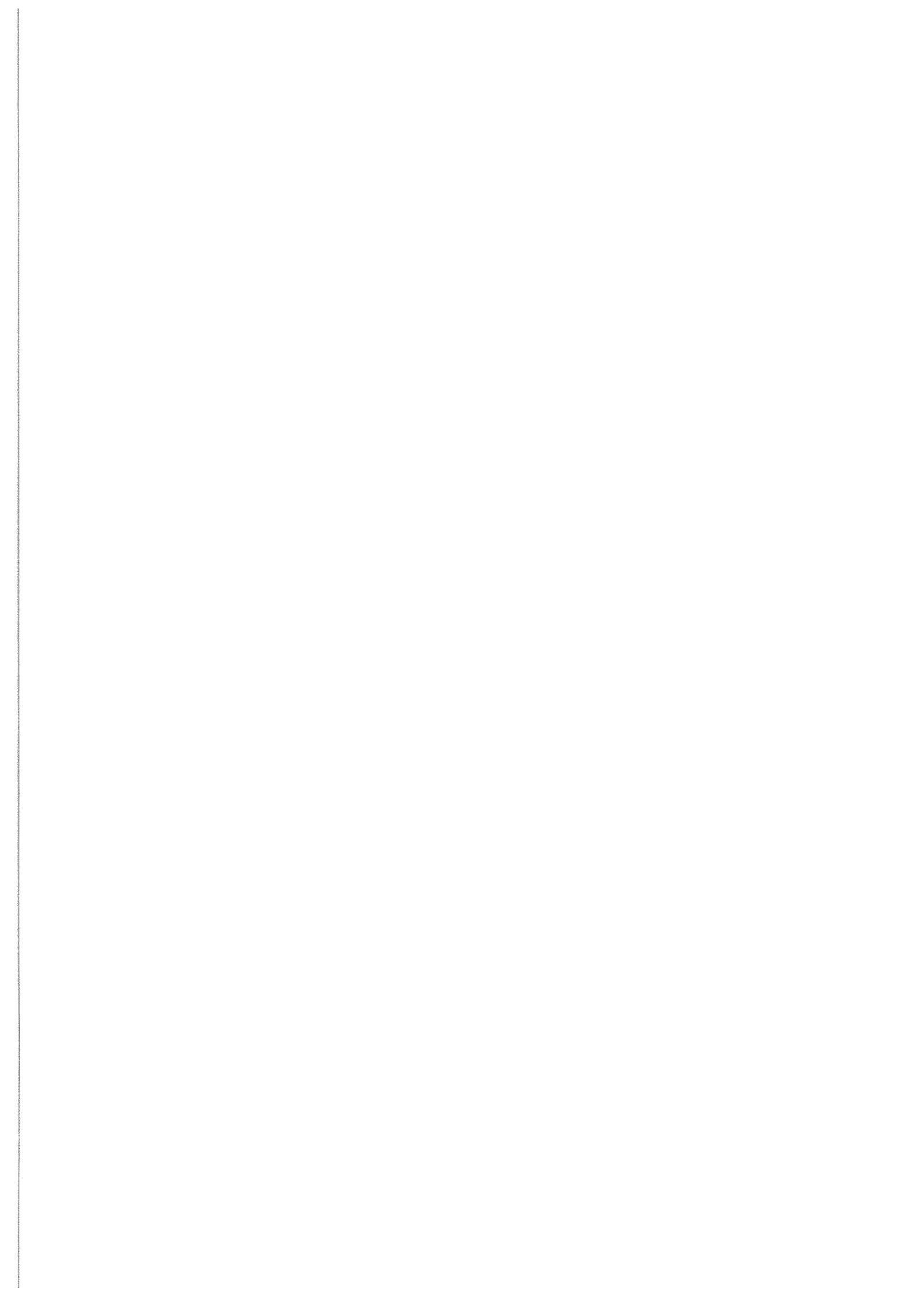
- [131] J. Schuster, F. Cichos, J. Wrachtrup, and C. V. Borczykowski. Diffusion of single molecules close to interfaces. *Single Mol.*, 4 :299–305, 2000.
- [132] F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H-J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer, and A. Pückthun. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *PNAS*, 97 :9972–9977, 2000.
- [133] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, and W. W. Webb. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J.*, 77 :2251–2265, 1999.
- [134] P. Schwille and E. Haustein. fluorescence correlation spectroscopy : an introduction to its concepts and applications. *Biophysics textbook on line*, 2004.
- [135] P. Schwille, S. Kummer, A. A. Heikal, W. E. Moerner, and W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *PNAS*, 97 :151–156, 2000.
- [136] P. Schwille, F.-J. Meyer-Almes, and R. Rigler. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.*, 72 :1878–1886, 1997.
- [137] R. Scott and D. Rusakov. Main detremination of presynaptic ca<sup>2+</sup>. *J. Neuroscience*, 26(26) :7071–7081, 2006.
- [138] P. J. Shaw and D. J. Rawlins. Three dimensinnal fluorescence microscopy. *Proc. Biophys. molec. Biol.*, 56 :187–213, 1991.
- [139] C. J. R. Sheppard and P. Török. Effects of specimen refractive index on confocal imaging. *J. of Microsc.*, 185(3) :366–374, 1997.
- [140] C. J. R. Sheppard and T. Wilson. Effect of spherical aberration on the imaging properties of scanning optical microscopes. *Appl. Opt.*, 18(7) :1058–1063, 1979.
- [141] A. P.de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunlaugsson, A. J. M. Huxley, C.P. McCoy, J. T. Rademacher, and T. E. Rice. Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chem. Rev.*, 97 :1515–1566, 1997.
- [142] L. Song, E. J. Hennink, T. Young, and H. J. Tanke. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 68 :2588–2600, 1995.

- [143] E. J. M. Speel, A. H. N. Hopman, and P. Komminoth. Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization : Play card(s). *J. Histochem. Cytochem.*, 47(3) :281–288, 1999.
- [144] T. Staudt, M. C. Lang, R. Medda, J. Engelhardt, and S. W. Hell. 2,20-thiodiethanol : A new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy. *Microscopy research and technique*, 70 :1–9, 2007.
- [145] S. J. Strickle and Robert A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.*, 37 :814, 1962.
- [146] W.-C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert, and R. P. Haugland. Synthesis of fluorinated fluoresceins. *J. Org. Chem.*, 62 :6469–6475, 1997.
- [147] K. Svoboda, W. Denk, D. Kleinfeld, and D. W. Tank. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*, 385(6612) :161–165, 1997.
- [148] J. R. Swedlow and M. Platani. Live cell imaging using wide-field microscopy and deconvolution. *Cell Struct. Funct.*, 27 :335–341, 2002.
- [149] Kanazawa T., Yamada S., Yamamoto T., and Tonomura Y. Reaction mechanism of the  $Ca^{2+}$ -dependent atpase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle : V. vectorial requirements for calcium and magnesium ions of three partial reactions of atpase : Formation and decomposition of a phosphorylated intermediate and atp-formation from adp and the intermediate. *J. Biochem.*, 70 :95–123, 1971.
- [150] D. Tautz and C. Pfeifle. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific rnas in drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma*, 98(2) :81–85, 1989.
- [151] A. Tessier, R. Méallet-Renault, P. Denjean, D. Miller, and R. B. Pansu. Conformational dynamics of calcium green 1 by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1 :5767–5769, 1999.
- [152] P. Tinnefeld, V. Buschmann, D. P. Herten, K. T. Han, and M. Sauer. Confocal fluorescence lifetime imaging microscopy (flim) at the single molecule level. *Single Mol.*, 3 :215–223, 2000.
- [153] R. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67 :509–544, 1998.

- [154] R. Y. Tsien. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons : Design, synthesis and properties of prototype structures. *Biochem.*, 19 :2396–2404, 1980.
- [155] R. Y. Tsien and A. Waggoner. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd ed. Plenum, 1995.
- [156] P. Török, S.J. Hewlett, and P. Varga. The role of specimen induced spherical aberration in confocal microscopy. *J. of Microsc.*, 188 :158–172, 1997.
- [157] B. Valeur. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2002.
- [158] S. Waddell and al. The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the drosophila brain that are critical for memory. *Cell*, 103 :805–813, 2000.
- [159] D.-S. Wan, M. Rajadhyaksha, and R. H. Webb. Analysis of spherical aberration of a water immersion objective : application to specimens with refractive indices 1.33–1.40. *J. of Microsc.*, 197(3) :274–284, 2000.
- [160] C. White and G. McGeown. Imaging of changes in sarcoplasmic reticulum [ca<sup>2+</sup>] using oregon green bapta 5n and confocal laser scanning microscopy. *Cell Calcium*, 31(4) :151–159, 2002.
- [161] J. Widengren, U. Me, and R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution : A theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.*, 99 :13368–13379, 1995.
- [162] J. Widengren and R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. *Cell. Mol. Biol.*, 44 :857–879, 1998.
- [163] J. Widengren, B. Terry, and R. Rigler. Protonation kinetics of gfp and fitc investigated by fcs : Aspects of the use of fluorescent indicators for measuring ph. *Chemical Physics*, 249 :259–271, 1999.
- [164] T. Wilson and A. R. Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Opt. Lett.*, 12(4) :227–229, 1987.
- [165] X. S. XIE. Single-molecule spectroscopy and dynamics at room temperature. *Acc. Chem. Res.*, 29 :598–606, 1996.

- [166] C. Xu, J. B. Shear, and W. W. Webb. Hyper-rayleigh and hyper-raman scattering background of liquid water in two-photon excited fluorescence detection. *Anal. Chem.*, 69 :1285–1287, 1997.
- [167] C. Xu and W. W. Webb. Measurement of two photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *JOSA B*, 13(3) :481–491, 1996.
- [168] C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. William, and W. W. Webb. Multiphoton fluorescence excitation : New spectral windows for biological nonlinear microscopy. *PNAS*, 93 :10763–10768, 1996.
- [169] H. Yoo, I. Song, and D.-G. Gweon. Measurement and restoration of the point spread function of fluorescence confocal microscopy. *J. of Microsc.*, 221(3) :172–176, 2006.
- [170] M. Young, B. Faulkner, and J. Cole. Resolution in optical systems using coherent illumination. *JOSA*, 60 :137–139, 1970.
- [171] S. J. Yu, M. W. Kang, H. C. Chang, K. M. Chen, and Y. C. Yu. Bright fluorescent nanodiamonds : No photobleaching and low cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :17604–17605, 2005.
- [172] Ch. Zander, J. Endrelein, and R. A. Keller. *Single molecule detection in solution : Methods and applications*. Willey-VCH, 2002.
- [173] T. Zars, M. Fischer, R. Schulz, and M. Heisenberg. Localization of a short-term memory in drosophila. *Science*, 288 :672–674, 2000.









---

# Resumé

La spectroscopie de molécule unique joue aujourd'hui un rôle majeur dans de nombreux domaines allant de la physique fondamentale à la biologie. Dans ce contexte, mes travaux ont conduit au développement théorique et instrumental de deux méthodes d'investigation orientées vers la biologie. La première visait à caractériser la dynamique de complexation du calcium par la sonde calcique fluorescente Oregon Green Bapta5N communément employée pour l'analyse des signaux intracellulaires. Pour y parvenir, nous avons développé un dispositif expérimental de spectroscopie de corrélation de fluorescence à un et deux photons présentant une sensibilité proche de la molécule unique. Grâce à ce dernier, nous avons pu étudier plusieurs aspects de la photophysique de la sonde et avons évalué ses limites ainsi que l'intérêt de l'appliquer *in vivo*. La seconde a consisté à développer une technique d'Hybridation In-Situ de Fluorescence (FISH) semi-quantitative afin de cartographier l'expression de gènes dans le cerveau de drosophiles adultes. Nous avons surmonté deux difficultés majeures, en obtenant, pour la première fois, des résultats reproductibles et semi-quantitatifs chez la drosophile adulte. Je présente ici une nouvelle approche où l'amplification enzymatique a été remplacée par une détection optimisée et un protocole réduisant l'impact de l'autofluorescence. Des résultats sur divers gènes exprimés dans le cerveau des drosophiles adultes y sont exposés au même titre qu'une étude visant à mieux comprendre une pathologie de retard mental. Pour conclure, j'ai mis en évidence la capacité de notre technique à résoudre des sondes uniques ce qui ouvre la voie vers de nouvelles applications.

## Abstract

Single-molecule-like spectroscopy plays a major role in many domains, from fundamental physics to biology. In this framework, my dissertation focuses on instrumental and theoretical developments of two biological-related applications. The first experiment aims at characterizing the dynamics of calcium binding by the fluorescent calcium probe Oregon-green Bapta5N commonly employed in cell signaling analysis. To achieve it, I have developed an experimental set-up of fluorescence correlation spectroscopy that exhibits sensitivity close to that of single-molecule detection. Either monophotonic or biphotonic excitations can be used. I have investigated the several aspects of the photophysics of the probe and evaluated the interest and limitations of such an approach for future *in-vivo* measurements. The second one is devoted to the development of a semi-quantitative Fluorescent In-Situ Hybridization (FISH) technique for mapping gene expression in the adult drosophila brain. Two difficulties have to be solved. First, we succeeded in obtaining reproducible results with drosophila adult brain. Secondly, while most of the FISH protocols are not quantitative since they need a strong enzymatic, we achieved semi-quantitative detection of RNA probes. I will present results on a new approach for which enzymatic detection is replaced by a sensitive detection and a protocol which reduces autofluorescence contribution. Results will be presented for several genes in adult drosophila brain to validate the methods as well as an interesting application on a mental retardation disease. To conclude, I show that the method exhibits a single RNA sensitivity which opens the way to new applications.

## Mots clés

Nanospectroscopie

Molécules uniques

Spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

Microscopie

Fluorescence

Hybridation in situ Fluorescente (FISH)

Drosophile

Oregon green Bapta 5N