THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI

présentée par
Viviane Devauges

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Sujet de la thèse :

MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE RESOLUE EN TEMPS ET EN POLARISATION POUR LE SUIVI D'INTERACTIONS PROTEIQUES EN NEUROBIOLOGIE

Soutenue le **15 décembre 2011**

Devant le jury composé de :

M. Arnaud DUBOIS	Codirecteur de thèse
Mme Sandrine LEVEQUE-FORT	Codirecteur de thèse
M. Martin OHEIM	Examinateur
M. Jean SALAMERO	Rapporteur
M. Marc TRAMIER	Rapporteur
Mme Nathalie WESTBROOK	Examinateur

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI

présentée par
Viviane Devauges

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Sujet de la thèse :

MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE RESOLUE EN TEMPS ET EN POLARISATION POUR LE SUIVI D'INTERACTIONS PROTEIQUES EN NEUROBIOLOGIE

Soutenue le **15 décembre 2011**

Devant le jury composé de :

M. Arnaud DUBOIS	Codirecteur de thèse
Mme Sandrine LEVEQUE-FORT	Codirecteur de thèse
M. Martin OHEIM	Examinateur
M. Jean SALAMERO	Rapporteur
M. Marc TRAMIER	Rapporteur
Mme Nathalie WESTBROOK	Examinateur

Microscopie de fluorescence résolue en temps et en polarisation pour le suivi d'interactions protéiques en neurobiologie

Mots clés : TIRF, FLIM, FRET, surfaces plasmoniques, interactions protéiques, neurobiologie, anisotropie de fluorescence, homoFRET.

Résumé :

Le suivi des interactions entre protéines, localisées à la membrane plasmique ou à l'intérieur de cellules, a été réalisé au cours de cette thèse par imagerie de fluorescence et par l'analyse de processus dits de FRET (*Forster Resonance Energy Transfer*). Pour quantifier le FRET entre nos protéines d'intérêt, nous avons choisi le contraste de durée de vie de fluorescence car cette méthode est indépendante de la concentration et de l'intensité de fluorescence. Afin d'obtenir une résolution suffisante pour des problématiques neurobiologiques, un microscope TIRFLIM (*Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) avait préalablement été développé. Celui-ci nous permet de faire de l'imagerie en plein champ avec une résolution axiale sub-longueur d'onde. Ce dispositif a été calibré et optimisé au cours de cette thèse pour répondre au mieux à des problématiques biologiques. Différentes approches ont ainsi été testées dans le but de calibrer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Des surfaces plasmoniques ont entre autres été utilisées pour augmenter la sélectivité axiale du montage.

Notre microscope a été dédié à l'étude de l'effet du cholestérol sur l'interaction entre la protéine précurseur de l'amyloïde APP, protéine transmembranaire impliquée dans la maladie d'Alzheimer et une de ses enzymes de clivage BACE1. Nous avons ainsi effectué un suivi dynamique de l'effet du cholestérol sur l'interaction entre APP et BACE1 dans des cellules HEK-293 et dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat, de la membrane plasmique à l'intérieur des cellules grâce à notre dispositif TIRFLIM.

La mesure d'anisotropie de fluorescence résolue en temps a également été implémentée sur notre montage. Ces mesures résolues en temps et en polarisation ont permis de mesurer le temps de corrélation rotationnelle de fluorophores et de mettre en évidence de manière qualitative différents niveaux d'homodimérisation de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer.

Time and polarisation resolved microscopy to follow proteins interactions in neurobiology

Key words : TIRF, FLIM, FRET, plasmonic surfaces, proteins interactions, neurobiology, fluorescence anisotropy, homoFRET.

Abstract:

In the framework of this thesis, we have used FRET (*Forster Resonance Energy Transfer*) as a mechanism to follow the interaction of proteins from the plasma membrane to the cytoplasm of cells. To quantify FRET, we have chosen Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) since this method is independent of the concentration and intensity of the fluorophores. To have a good axial resolution, a TIRFLIM set-up (*Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) was developed and this allowed us to perform wide-field imaging with sub-wavelength axial resolution. This set-up was calibrated and optimized in order to answer biological questions. Different approaches were tested in order to measure the penetration depth of the evanescent field and especially plasmonic surfaces were used to further enhance the axial resolution.

Our set-up was dedicated to the study of the effect of cholesterol on the interaction between the Amyloid Precursor Protein (APP), a transmembrane protein involved in Alzheimer Disease, and one of its cleaving enzyme (BACE1). We performed a dynamic tracking of APP and BACE1 proximity under the effect of cholesterol, in HEK-293 cells and primary cultures of embryonic rat hippocampal neurons, thanks to our TIRFLIM set-up.

Time-resolved fluorescence anisotropy has been implemented on our set-up. This has enabled us to measure the rotational correlation time of fluorophores and to investigate quantitatively different states of homodimerization of proteins involved in Alzheimer's disease.

A Mamie

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Bréchignac, directeur de l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), Christian Chardonnet, directeur du Laboratoire Charles Fabry (LCF) pour leur accueil au sein de leur laboratoire respectif. Ma thèse a été faite en co-tutelle entre ces deux laboratoires. Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à Christophe Jouvet, directeur du Centre Laser de L'Université Paris Sud (CLUPS), laboratoire dans lequel j'ai réalisé toutes les expériences effectuées au cours de ma thèse.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury, Jean Salamero et Marc Tramier qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail, Nathalie Westbrook qui a accepté de présider ce jury et Martin Oheim qui a accepté d'être examinateur. Merci au jury pour la discussion très riche au cours de ma soutenance.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à Patrick Georges responsable de l'équipe Lasers (et anciennement Lasers et Biophotonique) du LCF et du Centre de Photonique Biomédicale (CPBM) du CLUPS, ainsi qu'à Sandrine Lacombe responsable de l'équipe Biophotonique de l'ISMO, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe respective. Je remercie également très sincèrement Sandrine Lévêque-Fort et Arnaud Dubois, mes co-directeurs de thèse. Merci beaucoup Sandrine pour m'avoir proposé ce projet de recherche à l'interface entre l'optique et la biologie, comme je le souhaitais. Je te suis très reconnaissante de m'avoir laissé une grande liberté au cours de cette thèse, ce qui a été très enrichissant d'un point de vue personnel et m'a permis d'aborder de nombreuses thématiques. Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir su me conseiller et me guider lorsque cela était nécessaire. Je te remercie également pour ton ouverture d'esprit et pour m'avoir permis de participer à de nombreuses formations ainsi qu'à un grand nombre de conférences qui m'ont beaucoup apporté. Tu m'as aussi appris à prendre du recul et à relativiser et je t'en suis très reconnaissante. Fianium y a aussi un peu contribué ;).

J'adresse ensuite mes plus sincères remerciements à Catherine Marquer du Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (CRICM). Merci Catherine pour avoir collaboré avec nous sur ce projet. Merci pour ta rigueur, ta persévérance, ton ouverture d'esprit et ta patience pour expliquer (à plusieurs reprises…) à une non biologiste les mécanismes impliquant notre protéine préférée ou encore les statistiques. Je te remercie également pour l'investissement que tu as mis dans ce projet, pour ton soutien tout au long de ma thèse, que ce soit dans les longues séries de manips (n = 80 est devenu ma nouvelle référence ;-)) ou lors de la rédaction. J'ai énormément appris à tes côtés et cela a été un immense plaisir de travailler avec toi. Sans oublier, toutes les belles rencontres que nous avons pu faire ensemble (*crazy coco forever*).

Je tiens également à remercier très chaleureusement Sandrine Lécart, qui m'a fait découvrir le monde de la culture cellulaire et des transfections. Merci pour ta bonne humeur constante, ton dynamisme, tes fous rires, ton investissement dans le projet ou encore au sein du CLUPS pour que tout le monde s'y sente bien ! Merci pour avoir toujours été à l'écoute et pour ton soutien dans les moments difficiles. Cela a été un plaisir de travailler et d'échanger avec toi !

Je suis également très reconnaissante à Pierre Blandin dont j'ai poursuivi les travaux de recherche sur le microscope TIRFLIM. Merci pour ton encadrement (toujours avec le sourire) au cours de la rédaction de ton manuscrit et pour tout ce que tu m'as appris lors de mon stage de M2.

Je tiens également à remercier tous nos collaborateurs sans lesquels ce projet n'aurait pas pu aboutir. Pour la partie biologique, je remercie chaleureusement Marie-Claude Potier et Jack-Christophe Cossec du CRICM. Merci également à nos collaborateurs de l'Institut Curie : Frédéric Saudou, Sandrine Humbert, Géraldine Liot, Caroline Benstaali, Ghislaine Poizat et Diana Zala. Concernant l'anisotropie de fluorescence, je remercie très sincèrement Klaus Suhling ainsi que James Levitt et Pei Hua Chung du King's College à Londres pour leurs conseils et leur aide précieuse. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à nos collaborateurs de l'Institut Langevin, Emmanuel Fort, Karla Balaa, Olivier Loison et Yannick Goulam Houssen pour la partie plasmonique.

J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes que j'ai côtoyées au CLUPS au cours de ces trois ans et avec lesquels j'ai pu échanger. Pour la partie CPBM, je tiens à remercier Guillaume Dupuis pour ses nombreux conseils relatifs à l'enseignement ainsi que pour la rédaction du manuscrit (pour le fond et la forme !). I would also like to thank Siddharth Sivankutty for his help in English and also for his good advice on geeky stuff. Bon courage pour la suite Sid and don't forget to pratice your French ! Je suis également reconnaissante à nos collègues médecins Antoine Monsel et Laurent Dupic. Merci Antoine de m'avoir fait découvrir le service de réanimation chirurgicale de la Pitié-Salpêtrière et pour tes histoires à la Dr House. Merci Laurent pour ta bonne humeur, pour tous les petits déjeuners très diététiques et pour nos grandes discussions sur Ryan.

Pour la partie Serveur Laser (SELA), je tiens tout particulièrement à remercier Michel Broquier. Merci Michel pour ton aide précieuse au cours de ma thèse, que ce soit par nos discussions scientifiques, par ton *coaching* pour la soutenance, par tes nombreux conseils en Tai Chi et Qi Gong (tu fais l'ours mieux que personne :P), par tes visites surprises chez Pinaud ou encore par tes bonnes recettes (ton fiadone va me manquer !). Je tiens également à remercier Claude Dedonder-Lardeux, ainsi que Aifan Alata. Et je n'oublie pas Chantal Jucha, la gestionnaire du CLUPS. Merci Chantal pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ton efficacité, tes bons desserts (je ne sais lequel choisir !) et ta gourmandise. Je vais regretter nos petites pauses « dégustation » et nos « discussions philosophiques ».

J'ai également au cours de cette thèse interagi avec de nombreuses personnes de l'ISMO et je les remercie pour ces échanges : Marie-Pierre Fontaine–Aupart, Karine Steenkeste, Qing Li Kou, Anne Zehnacker-Rentien, Pierre Carçabal, Samia Daddi Oubekka, Erika Porcel ainsi que Christophe Lefumeux. Merci Christophe pour ta bonne humeur constante et tes dépannages optiques express. Je remercie également les personnes des services administratif, électronique et mécanique de l'ISMO qui m'ont aidée au cours de ces trois années.

J'adresse également de sincères remerciements à toutes les personnes avec lesquelles j'ai interagi à l'Institut d'Optique. Merci à toute l'équipe Lasers pour son accueil lors de mes passages à l'Institut dans le cadre du monitorat ou bien lors des traditionnels SAUCEPAN et PINIOUF. Je remercie particulièrement Frédéric Druon, Julien Moreau et Delphine Sacchet qui m'ont reconciliée avec les travaux pratiques d'électronique. Un grand merci à Nathalie Westbrook, David Dulin, Antoine le Gall ainsi qu'à Thierry Avignon et Cédric Lejeune pour leur aide sur les travaux pratiques d'optique. Merci également à Igor pour son aide dans la logistique et pour son célèbre punch !

Je suis également reconnaissante au Service Universitaire des Activités Physiques et Sportives (SUAPS) ainsi qu'à l'Association Sportive des Etudiants en Sciences du Campus d'Orsay (ASESCO), pour leur large choix d'activités sportives, qui permettent de se vider la tête entre deux séries de manips ! Merci à Thierry Eveque pour ses cours qui permettent de bien se défouler, n'est-ce pas Erika ;-). Merci également à Denis et Hervé Grasset pour leur cours de Tai Chi, toujours dans la bonne humeur. Je remercie également Béatrice Reynier pour les cours de Qi Gong, une marche énergétique mémorable et pour m'avoir initiée à l'art de la détente.

Je tiens enfin à remercier ma famille et tout particulièrement mon arrière grand-mère, ma grand-mère et mon frère qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse, m'ont permis d'avancer et de mener à bien ce projet. Sans oublier ma Françoise pour son optimisme et ses lunettes roses qui me sont

bien utiles ainsi que Nathalie et ses deux petits anges pour ses bons conseils et son soutien. Un grand merci également à mes amis qui m'ont épaulée au cours de cette thèse. Merci à Carine qui sait réveiller la grande sportive qui sommeille en moi ;-). Je suis en particulier très reconnaissante à Solenne, Aude, Gaëlle pour avoir été là au cours de ces trois années et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Et pour finir, un immense merci à Zouzou ma grande sœur.

TABLE des MATIERES

TABLE des MATIERES ____ *1*

ABREVIATIONS ____ *5*

INTRODUCTION ____ *9*

Chapitre I : Contexte de l'étude et état de l'art ____ *11*

1 Principe de la fluorescence ____ **11**
1.1 Mécanisme de la fluorescence ____ 11
1.2 Grandeurs caractéristiques de la fluorescence ____ 12
1.2.1 Durée de vie de fluorescence ____ 12
1.2.2 Rendement quantique de fluorescence ____ 13
1.3 Les marqueurs fluorescents ____ 14
1.3.1 Marqueurs organiques ____ 14
1.3.2 *Quantums dots* ____ 14
1.3.3 Protéines fluorescentes ____ 14

2 Choix de la configuration optique pour l'étude de phénomènes à l'interface substrat/échantillon ____ **15**
2.1 Microscopie sous illumination structurée ____ 15
2.2 Microscopie 4Pi ____ 16
2.3 Microscopie STED ____ 17
2.4 Microscopie à onde évanescente ____ 18
2.5 Techniques de superlocalisation ____ 18
2.6 Microscopie supercritique ____ 19

3 Microscopie de fluorescence résolue en temps ____ **20**
3.1 Domaine temporel ____ 20
3.1.1 Méthode de comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC) ____ 20
3.1.2 Mesures de durée de vie de fluorescence avec un intensificateur à déclenchement périodique ____ 22
3.2 Domaine fréquentiel ____ 23
3.3 Analyses des mesures ____ 25
3.3.1 Détermination de la durée de vie de fluorescence par ajustement mono ou multi-exponentiel ____ 25
3.3.2 Détermination de la durée de vie de fluorescence sans ajustement ____ 26

4 Suivi d'interactions moléculaires par imagerie de FRET ____ **28**
4.1 FRET : Principe et conditions ____ 28
4.2 Mises en œuvre pour la détection ____ 30
4.2.1 Imagerie de FRET en intensité de fluorescence (méthode ratiométrique) ____ 30
4.2.2 Imagerie de FRET par photoblanchiment de l'accepteur ____ 31
4.2.3 Mesure du FRET par mesure de durée de vie de fluorescence ____ 32

5 Autres techniques pour suivre des interactions moléculaires ____ **33**
5.1 BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* ____ 33
5.2 BiFC : *Bimolecular Fluorescence Complementation* ____ 33
5.3 La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) ____ 34
5.4 La spectroscopie en corrélation croisée de fluorescence (FCCS) ____ 36
5.5 Anisotropie de fluorescence ____ 37
5.6 Analyse de la brillance ____ 37

6 Projet 38

Chapitre II : Microscope TIRFLIM *41*

1 Principe de la microscopie TIRF 41
1.1 Principe physique de la réflexion totale interne 41
1.2 Application en microscopie de fluorescence 44
1.3 Configurations utilisées 45
1.3.1 Configuration TIRF avec prisme 45
1.3.2 Configuration « à travers l'objectif » 46

2 Présentation du microscope TIRFLIM 47
2.1 Mesure FLIM en plein champ 48
2.2 Schéma du montage 48
2.3 Interface pour le pilotage, l'acquisition et le traitement 53
2.4 Mesures de durée de vie de fluorescence sous excitation TIRF et en épifluorescence : effet de l'interface 56

3 Calibrations et optimisation du dispositif TIRFLIM 57
3.1 Calibration de la voie de détection résolue en temps 57
3.2 Calibrations : mesure de la résolution spatiale en illumination en épifluorescence et en TIRF 58
3.2.1 Résolution latérale 59
3.2.2 Résolution axiale 60
3.3 Recherche de la profondeur de pénétration du champ évanescent 61
3.3.1 Evaluation de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente sous excitation TIRF 61
3.3.2 Utilisation de surfaces plasmoniques 65
3.3.2.1 Conditions d'existence et relation de dispersion 65
3.3.2.2 Exaltation de la fluorescence et diminution de la durée de vie de fluorescence à la proximité d'une surface métallique 67
3.3.2.3 Dispositif SPETIRF 69
3.3.2.4 Evaluation de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente sous excitation SPETIRF 71
3.4 Imagerie cellulaire en SPETIRF sur cellules vivantes et fixées 74

Chapitre III : Etude de l'hétérodimérisation de deux protéines impliquées dans la Maladie d'Alzheimer *79*

1 Problématique biologique : la maladie d'Alzheimer 79
1.1 La maladie d'Alzheimer 79
1.1.1 Quelques chiffres 79
1.1.2 Les différentes formes de maladie d'Alzheimer et leur étiologie 79
1.1.3 Symptômes et caractéristiques neuro-pathologiques de la maladie 80
1.2 La protéine précurseur de l'amyloïde APP 81
1.3 Rôle du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer 82

2 Suivi dynamique de l'effet du cholestérol sur l'interaction entre APP et BACE1 de la membrane plasmique à l'intérieur des cellules 84
2.1 Protocole 84
2.1.1 Types cellulaires utilisés 84
2.1.2 Couple FRET GFP/mCherry et conditions d'expression 84
2.1.3 Mesures de durée de vie de fluorescence et effet du cholestérol 85
2.2 Analyse statistique 86
2.3 Résultats obtenus 86
2.3.1 Contrôle de la stabilité de la durée de vie de la GFP au cours du temps 86
2.3.2 Résultats obtenus en cellules HEK-293 87
2.3.2.1 Avant ajout du cholestérol 87
2.3.2.2 Effet aux temps courts après ajout du cholestérol (0-8 min) 88
2.3.2.3 Effet aux temps longs après ajout du cholestérol (30 min) 89
2.3.3 Résultats obtenus sur des neurones d'hippocampe d'embryons de rat 89
2.3.3.1 Avant ajout du cholestérol 90
2.3.3.2 Effet aux temps courts après ajout du cholestérol (0-8 min) 90

2.3.3.3 Effet aux temps longs après ajout du cholestérol (30 min) 92
2.3.4 Synthèse des résultats et discussion 92

Chapitre IV : Anisotropie de fluorescence 97

1 Anisotropie de fluorescence résolue en temps (tr-FAIM) 97
1.1 Principe de l'anisotropie de fluorescence 97
1.1.1 Théorie 97
1.1.2 Prise en compte de la photosélection des molécules à l'excitation et de l'orientation des dipôles d'absorption et d'émission 99
1.2 Anisotropie de fluorescence résolue en temps 100
1.3 Applications du tr-FAIM 100
1.3.1 Mesure de la diffusion rotationnelle des molécules 100
1.3.2 Suivi de l'interaction entre molécules (homoFRET) 102
1.4 Facteurs correctifs 102
1.4.1 Facteur G 103
1.4.2 Facteur x_{ON} 103

2 Mise en place et calibration du dispositif tr-FAIM 105
2.1 Dispositif expérimental 105
2.1.1 Polarisation de l'excitation 105
2.1.2 Détection résolue en polarisation 105
2.1.3 Traitement informatique 106
2.2 Validation du dispositif avec des solutions de fluorescéine de différentes viscosités 107
2.2.1 Gamme de viscosité 107
2.2.2 Caractérisation des solutions de fluorescéine avec l'objectif 10x 107
2.2.3 Détermination du facteur x_{ON} 109
2.2.4 Variation du temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine en fonction de la viscosité de la solution pour l'objectif 60x. 111
2.2.5 Vérification du rayon de la fluorescéine avec des mesures de FCS 112
2.3 Validation du dispositif sur cellules HEK-293 exprimant eGFP cytosolique ou un tandem eGFP-eGFP 113
2.3.1 Quantification du facteur x_{ON} en cellules HEK-293 113
2.3.2 Déclins d'anisotropie obtenus 114
2.4 Anisotropie sous onde évanescente 116
2.4.1 Condition sur la polarisation de l'excitation 116
2.4.2 Détermination des facteurs correctifs sous excitation TIRF 116
2.4.2.1 Facteur G 116
2.4.2.2 Facteur x_{ON} 117

3 Application biologique : dimérisation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) 118
3.1 Mesures sous excitation en épifluorescence 118
3.2 Mesures sous excitation TIRF 120
3.3 Discussion et conclusions 120

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES 123

ANNEXES 125

ANNEXE II.1 : Caractérisation du microscope TIRFLIM 126

ANNEXE II.2 : Condition d'existence et de couplage des ondes de surface 128

ANNEXE II.3 : Marquages utilisés en SPETIRF 130

ANNEXE III.1 : Transfection chimique 131

ANNEXE III.2 : Electroporation 133

ANNEXE IV.1 : Polariseurs 135

BIBLIOGRAPHIE 137

ABREVIATIONS

Aβ : Peptide amyloïde

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ApoE : Apolipoprotéine E

APP : Amyloid Precursor Protein

ARN: Acide RiboNucléique

BACE1: β-sécrétase

CB1R : Type 1 Cannabinoid Receptor

CCD : Charge Coupled Device

CFP : Cyan Fluorescent Protein

CLUPS: Centre Laser de l'Université Paris Sud

CPBM : Centre de Photonique BioMédicale

CRICM: Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DV: Dual View

EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid

EGF: Epidermal Growth Factor

EM-CCD : Electron Multiplier Charge Coupled Device

emFRET : energy migration FRET

FAD : Familiale Autosomique Dominante

FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy

FCCS: Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy

FIDA: Fluorescence Intensity Distribution Analysis

FITC : Fluoresceine Iso Tio Cyanate

FLIM : Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

GFP : Green Fluorescent Protein

GUV: Giant Unilamellar Vesicle

HEK-293 : Human Embryonic Kidney

HRI : High Rate Imager

HSV : Hue Saturation Value

ISMO: Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay

LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LCFIO : Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique

LEDs : Light Emitting Diodes

MβCD-cholestérol : Méthyl-β-CycloDextrine-cholestérol

MW: Molecular Weight

ON : Ouverture Numérique

PAA : Poly-Alyl-Amine

PALM : Photo-Activation Localization Microscopy

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCH : Photon Counting Histogram

PFA : ParaFormAldéhyde

PSF : Point Spread Function

QDs : Quantum Dots

RET : Resonance Energy Transfer

RICS : Raster Scanning Image Correlation Spectroscopy

SAF: Supercritical Angle Fluorescence

SFLIM : Spectral Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

SIM : Structured Illumination Microscopy

SLIM : Spectral Lifetime Imaging Microscopy

SLM: Spatial Light Modulator

SNOM: Scanning Near-Field Optical Microscope

SPAD : Single Photon Avalanche Diode

SPCE: Surface Plasmon Cross Emission

SPETIRF: Surface Plasmon Enhanced Total Internal Reflection Fluorescence

SPMFM: Surface Plasmon Mediated Fluorescence Microscopy

SPP : Surface Plasmon Polariton

SSIM : Saturated Structured Illumination Microscopy

STED: STimulated Emission Depletion

STORM: Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

SVF: Sérum de Veau Fœtal

SW FCCS: Single Wave Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy

TCSPC : Time Correlated Single Photon Counting

TE: Transverse Electrique

THV : Tetrafluoroethylene-Hexafluoropropylene-Vinylidene fluoride

TIRF(M) : Total Internal Reflection Fluorescence (Microsccopy)

TM: Transverse Magnétique

tr-FAIM : time-resolved Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy

tr-TIRFAIM: time-resolved Total Internal Reflection Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy

TXRED : Texas Red

YFP : Yellow Fluorescent Protein

INTRODUCTION

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit porte sur « la microscopie de fluorescence résolue en temps et en polarisation pour le suivi d'interactions protéiques en neurobiologie ». Ce doctorat a été effectué en co-tutelle entre l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO) et le Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique (LCFIO). Toutes les expériences présentées ont été réalisées au Centre de Photonique Biomédicale (CPBM) du Centre Laser de l'Université Paris Sud (CLUPS). Le CLUPS est une plateforme d'applications dans le domaine des sciences physico-chimiques ainsi que des sciences de la vie et de la santé. Dans le cadre de notre étude, nous avons établi des collaborations avec le Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (CRICM) à Paris, avec l'Institut Curie à Orsay, avec l'Institut Langevin à Paris ainsi qu'avec le King's College à Londres.

Au cours des quinze dernières années, la microscopie a évolué pour pouvoir répondre aux questions complexes posées par la biologie, telles que la localisation de molécules dans une cellule ou dans un tissu, le suivi de leur proximité avec les molécules voisines ou de leurs interactions avec leur environnement à des échelles allant du nanomètre à la dizaine de micromètres. Le choix de la modalité d'imagerie doit pouvoir mettre en évidence ces phénomènes pour faire le lien avec les fonctions biologiques sous-jacentes. Le développement de sondes ainsi que les progrès réalisés sur les sources lasers et les composants optiques, ont contribué à un véritable renouveau de la microscopie de fluorescence et à l'essor de nouvelles modalités de microscopie appliquées à la biologie.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre des protéines membranaires impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Pour suivre cette interaction, nous avons utilisé la microscopie de fluorescence sous excitation en réflexion totale interne résolue en temps (TIRFLIM) et en polarisation. Une première version du montage TIRFLIM avait été développée au cours de la thèse de Pierre Blandin. Elle a permis de valider le dispositif avec des échantillons biologiques modèles. Dès mon arrivée en stage de Master 2, nous avons identifié ensemble les points critiques à modifier afin que l'on dispose d'un dispositif qui offre une bonne reproductibilité, nécessaire pour des applications en biologie. Nous avons ainsi choisi d'utiliser les contrastes de durée de vie de fluorescence ainsi que la polarisation de la fluorescence pour pouvoir répondre à des questions biologiques relatives à la dimérisation de protéines.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre présentera la microscopie de fluorescence résolue en temps et fera un état de l'art des différentes techniques permettant de suivre des interactions moléculaires. Les différentes configurations optiques offrant une résolution axiale sous les 100 nm seront également présentées. Le projet que nous avons mené au cours de ces trois années sera également introduit dans ce contexte. Dans le second chapitre, le microscope TIRFLIM qui a été optimisé au cours de ma thèse ainsi que les différentes approches développées afin de calibrer la profondeur de pénétration, seront décrites. Nous aborderons également l'utilisation de surfaces plasmoniques pour augmenter la sélectivité axiale. Dans le troisième chapitre, nous nous intéressons à l'utilisation de ce microscope TIRFLIM pour suivre l'hétérodimérisation de deux protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Dans le quatrième et dernier chapitre sont détaillées l'implémentation de la mesure d'anisotropie de fluorescence résolue en temps sur notre dispositif TIRFLIM et l'utilisation conséquente de notre microscope pour mettre en évidence de manière qualitative différents niveaux d'homodimérisation de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer.

Chapitre I : Contexte de l'étude et état de l'art

Dans ce premier chapitre nous allons introduire tout d'abord les concepts théoriques relatifs à la fluorescence. Nous présenterons ensuite les différents développements technologiques permettant d'améliorer la résolution axiale en microscopie de fluorescence et permettant une résolution temporelle de cette fluorescence. Puis, nous aborderons les techniques d'imagerie utilisées pour effectuer des suivis d'interactions moléculaires.

1 Principe de la fluorescence

1.1 Mécanisme de la fluorescence

La fluorescence est un des processus de luminescence par lequel une molécule passe d'un état électronique excité à un état d'énergie plus basse, en émettant de la lumière. La fluorescence peut ainsi être définie comme la propriété de certains corps à absorber la lumière à une certaine longueur d'onde pour l'émettre ensuite à une longueur d'onde plus grande (loi empirique de Stokes), ceci après un intervalle de temps moyen qui va correspondre à la durée de vie de fluorescence.

Le processus de fluorescence se compose de trois étapes avec des temps caractéristiques très distincts : l'excitation, les relaxations vibrationnelles et l'émission de fluorescence. L'excitation d'une molécule fluorescente s'effectue par absorption de photons. La durée caractéristique associée à ce processus est de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s) alors que les durées associées aux relaxations vibrationnelles sont de l'ordre de la picoseconde (10^{-12} s). Le processus final d'émission de fluorescence s'opère sur des temps plus longs de l'ordre de la nanoseconde (10^{-9} s).

Une molécule possède différents états excités (S_0, S_1, S_2, Fig.1.1) et chaque état est divisé en un certain nombre de niveaux d'énergie vibrationnels associés au noyau atomique ainsi qu'aux orbitales de liaison. Le diagramme de Perrin-Jablonski représente les différents niveaux d'énergie impliqués dans l'absorption et l'émission de lumière par un fluorophore. On peut ainsi caractériser un fluorophore par ses spectres d'absorption et d'émission de fluorescence (Fig.1.1).

Après l'absorption d'un photon, plusieurs processus peuvent intervenir mais le plus probable est la relaxation vers le niveau vibrationnel le plus bas du premier état électronique excité. Il s'agit des processus de relaxation vibrationnelle ou conversion interne, par lesquels l'énergie est perdue sans émission de lumière et est transférée sous forme de chaleur aux autres molécules environnantes. Le passage du plus bas niveau vibrationnel de l'état excité au niveau fondamental S_0 peut s'accompagner d'émission de lumière, il s'agit dans ce cas-là de la fluorescence, dont la longueur d'onde d'émission est plus grande que la longueur d'onde d'absorption.

D'autres processus peuvent entrer en compétition avec l'émission de fluorescence. La molécule à l'état excité peut ainsi retourner au niveau fondamental de façon non radiative par transfert de chaleur. Des interactions avec d'autres molécules peuvent induire des transferts non radiatifs d'énergie (FRET), phénomènes que nous détaillerons par la suite. L'énergie peut également être transmise au plus bas état triplet excité, lors de croisements intersystèmes. De manière générale, à température ambiante, la désexcitation de l'état triplet à l'état fondamental se fait de manière non radiative. En revanche, à de faibles températures, cette désexcitation devient radiative et correspondra à de la phosphorescence. L'émission de phosphorescence a lieu à une longueur d'onde plus haute que

l'émission de fluorescence (étant donné que l'énergie du niveau vibrationnel le plus bas de l'état triplet est plus faible que celle de l'état S_1) et les durées de vie associées sont beaucoup plus longues (supérieures à la milliseconde) [1].

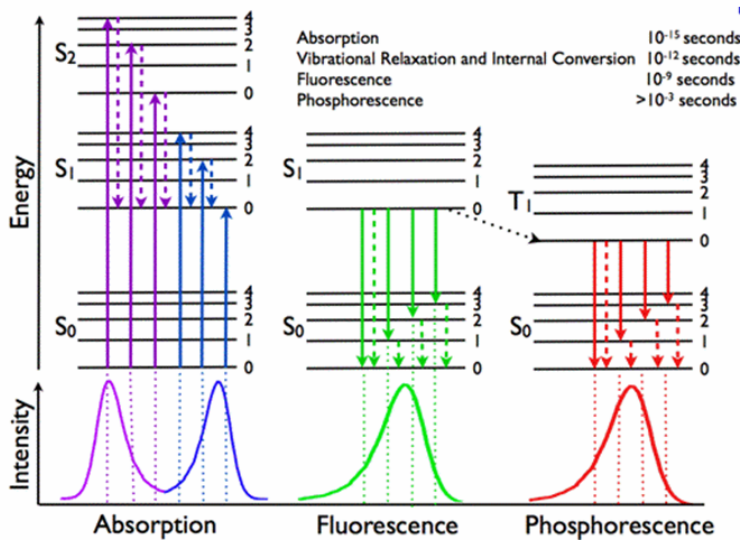


Fig.1.1 : Diagramme de Perrin-Jablonski. Sur ce diagramme, les principales désexcitations radiatives d'une molécule sont représentées. Les états électroniques singulets sont notés S_0 (fondamental), S_1, S_2 pour le premier et deuxième état électronique excité. Les premier et deuxième états électroniques triplets sont notés T_1 et T_2. Différents niveaux vibrationnels sont associés à chaque état électronique. Les processus d'absorption et d'émission sont représentés par des flèches pleines alors que les relaxations vibrationnelles et conversions intersystèmes sont représentées par des flèches pointillées [http://www.photobiology.info/Visser-Rolinski.html].

1.2 Grandeurs caractéristiques de la fluorescence

1.2.1 Durée de vie de fluorescence

Lors de l'émission de fluorescence, toutes les molécules présentes sur le premier état excité S_1 vont pouvoir retourner à l'état fondamental S_0 par deux processus correspondant à une désexcitation non radiative (dont la probabilité est noté k_{nr}) et à l'émission de fluorescence (dont la probabilité est noté k_r) (Fig.1.2).

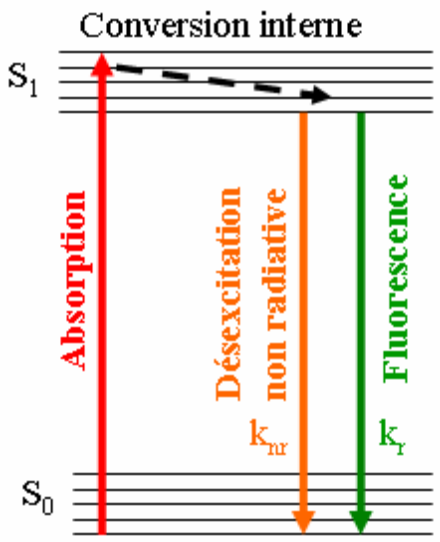


Fig.1.2 : Diagramme de Jablonski simplifié

Soit $N(t)$ la population de fluorophores se trouvant à l'état excité, la dépopulation de l'état excité va être fonction des deux probabilités de désexcitation radiative et non radiative et est donnée par l'équation différentielle ci-dessous :

$$-\frac{dN(t)}{dt} = (k_r + k_{nr})N(t) \tag{1.1}$$

$$\text{d'où } N(t) = N_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \tag{1.2}$$

$$\text{avec } \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \tag{1.3}$$

où τ représente la durée de vie de fluorescence de la molécule qui rend compte de la durée moyenne pendant laquelle la molécule va se trouver dans l'état excité avant de repasser à l'état fondamental. On considère que la probabilité de désexcitation non radiative regroupe tous les processus qui vont induire un retour à l'état fondamental de la molécule sans émission de photon, tels que des collisions, les interactions moléculaires (FRET) et autres phénomènes de *quenching*. Le *quenching* correspond à une extinction momentanée de la fluorescence à la différence du photoblanchiment qui est la perte définitive de la capacité à fluorescer.

1.2.2 Rendement quantique de fluorescence

Un paramètre important relatif à l'intensité de fluorescence est le rendement quantique de fluorescence η. Ce dernier est le quotient du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Il est donc donné par la relation :

$$\eta = \frac{k_r}{k_{nr} + k_r} \tag{1.4}$$

Ce rendement est compris entre 0 et 1. Le rendement sera quasiment égal à 1 dans le cas où $k_{nr} << k_r$, ce qui correspondra à un signal de fluorescence intense. La diminution de l'intensité de fluorescence $i(t)$ peut être reliée au rendement quantique η et à la dépopulation de l'état excité $N(t)$ par la relation ci-dessous :

$$i(t) = \eta \times \left(-\frac{dN(t)}{dt}\right) \tag{1.5}$$

D'après l'équation précédente et les relations (1.2) et (1.4), on en déduit :

$$i(t) = k_r N_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \tag{1.6}$$

où I_0 est l'intensité mesurée à $t = 0$. Le déclin de fluorescence a un comportement exponentiel et permet de déterminer la durée de vie de fluorescence de l'espèce suivie.

D'après la relation (1.3), on constate que la durée de vie de fluorescence dépend des caractéristiques du fluorophore choisi mais également de son environnement. Elle va ainsi apporter des informations complémentaires à la mesure en intensité, en renseignant sur les interactions moléculaires et sur l'environnement physico-chimique des molécules. Sa valeur dans les milieux biologiques est typiquement comprise entre 1 et 10 ns. Par ailleurs, la durée de vie de fluorescence a l'avantage d'être indépendante de la concentration du fluorophore (par conséquent du niveau d'expression de celui-ci en cellules biologiques), des caractéristiques de l'excitation et constitue donc une mesure relative, spécifique du fluorophore observé. La « vie publique du fluorophore » est la fenêtre temporelle pendant laquelle on pourra suivre un processus dynamique relatif à la molécule d'intérêt et est comprise entre $\tau/100$ et 10τ [1].

1.3 Les marqueurs fluorescents

Le choix du fluorophore le plus adapté à son application est une étape très importante. Des fluorophores endogènes sont naturellement présents dans les organismes biologiques (NADH, flavines…). Ce sont eux qui sont à l'origine de l'autofluorescence cellulaire. Cependant ces marqueurs sont peu contrastés, difficilement contrôlables et ne permettent pas d'identifier des entités différentes. Il apparaît alors nécessaire d'utiliser un marquage spécifique en introduisant des sondes adaptées. Dans tout les cas, il faut s'assurer que le niveau du signal d'autofluorescence à la longueur d'onde d'observation est bien inférieur au signal de fluorescence spécifique.

1.3.1 Marqueurs organiques

De nombreux marqueurs organiques fluorescents ont ainsi été synthétisés pour permettre un marquage spécifique des entités cellulaires ou pour monitorer *in situ* des variations d'environnement. Ces sondes possèdent généralement des rendements quantiques importants et présentent des déplacements de Stokes suffisants pour séparer facilement le signal de fluorescence du faisceau d'excitation et permettre d'effectuer des marquages multiples sans avoir de recouvrement spectral. Des sondes organiques ont ainsi été développées pour marquer les membranes des mitochondries (*MitoTracker*) ou les acides nucléiques des brins d'ADN (*Dapi*), etc...

1.3.2 *Quantums dots*

Dans le but de pallier les lacunes des fluorophores organiques, des sondes fluorescentes faites à partir de nanomatériaux, les *quantums dots,* ont été développées et sont utilisées pour des applications en biologie et en médecine [2]. En effet, ces sondes ont une forte brillance (liée à leur fort rendement quantique) et une photostabilité plus importante, ce qui rend ces particules moins sensibles au photoblanchiment. De plus, ces sondes offrent une accordabilité de la longueur d'onde d'émission de fluorescence qui est fonction directe de leur taille. Elles possèdent également un large spectre d'absorption permettant d'utiliser une seule source excitatrice et d'avoir différentes longueurs d'onde d'émission possibles. Grâce à leur durée de vie de fluorescence plus longue (10-50 ns), les particules fluorescentes inorganiques permettent de suivre des processus dans des fenêtres temporelles plus grandes ou offrent des dynamiques de quantification de variation de signal plus importantes par rapport aux molécules fluorescentes organiques. Cependant, ces particules inorganiques présentent certains désavantages tels que leur taille qui reste bien supérieure à celle des fluorophores organiques et peut perturber un système biologique. D'autre part, la plupart des QDs sont toxiques (cœur formé de métaux lourds type CdSe), ce qui est gênant pour les applications en milieu vivant. Le scintillement de ces particules est un autre facteur qui peut perturber le signal de fluorescence, notamment quand ils sont utilisés pour le suivi de molécules.

1.3.3 Protéines fluorescentes

La révolution pour les applications en biologie a été la découverte de protéines fluorescentes telles que la « *Green Fluorescent Protein* » (GFP), qui provient de la méduse *Aequorea Victoria*. En effet, par encodage génétique, ces protéines fluorescentes peuvent être produites directement par la cellule et elles permettent de marquer spécifiquement les protéines que l'on souhaite étudier. Ainsi, la GFP constitue une sonde fluorescente ayant un rendement quantique élevé et compatible avec le vivant en raison notamment de sa bonne photostabilité et sa faible phototoxicité. Des mutations diverses ont permis d'obtenir des dérivés de la GFP et une large gamme spectrale de fluorophores (CFP, YFP,…) (Fig.1.3). Ces fluorophores permettent notamment de faire des multi-marquages (protocole de transfection, Annexe III.1), des expériences de transfert d'énergie (FRET), etc…

Les avancées en chimie et en bioingéniérie ont permis de développer des fluorophores pour toutes les gammes de longueurs d'onde [3] et d'optimiser les caractéristiques de ces sondes. De nouvelles protéines fluorescentes émettant dans le rouge « lointain » et dans le bleu (Tag BFP,[4]) ont

ainsi été synthétisées dans le souci d'améliorer leur photostabilité et leur stabilité au pH. Des protéines fluorescentes photoactivables ont également été développées pour le suivi de molécule unique et pour l'imagerie à haute résolution (comme le PALM, *Photo-Activation Localization Microscopy* [5], [6]). Des sondes fluorescentes qui changent de couleurs avec le temps ont également été créées (*fluorescent timers*) telles que DsRedE5 protéine dont l'expression va varier avec le temps du vert au rouge. C'est un bon outil pour suivre le développement d'organelles et la dynamique d'expression des gènes associés [7]. De plus la découverte de la propriété de photoconversion de la GFP du vert au rouge peut présenter un intérêt pour des études en biologie.

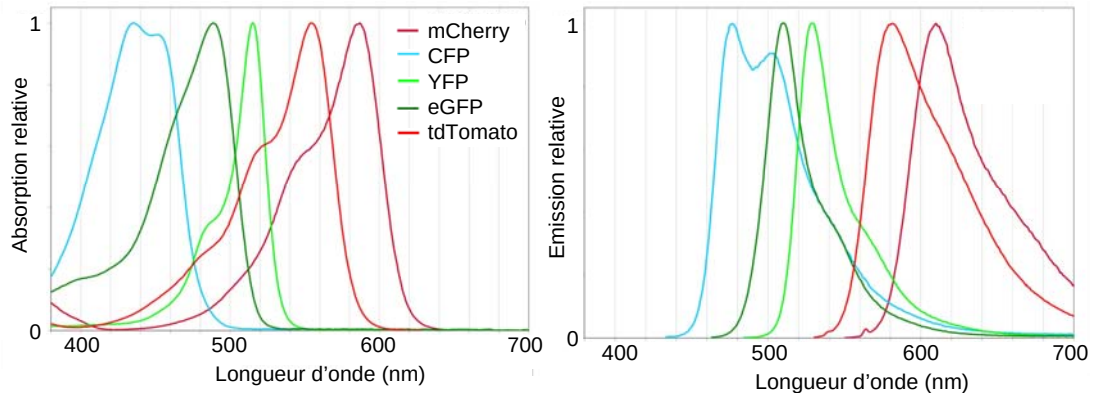


Fig.1.3 : Spectres d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) de la GFP et de quelques dérivés (eGFP, CFP, YFP) ainsi que mCherry, tdTomato [http://www.bio.utk.edu/cellbiol/markers/].

De nombreux marqueurs fluorescents sont donc à disposition suivant l'application que l'on souhaite mettre en oeuvre. La connaissance des caractéristiques du fluorophore utilisé et du complexe formé par la molécule d'intérêt et son fluorophore (sites de fixation des sondes fluorescentes) est nécessaire pour bien comprendre et analyser les mesures de fluorescence effectuées.

Les principes fondamentaux de la fluorescence ayant été rappelés, nous allons maintenant aborder les différentes configurations optiques permettant d'étudier des phénomènes ayant lieu à l'interface substrat/échantillon soit dans les 100 premiers nanomètres de l'échantillon observé.

2 Choix de la configuration optique pour l'étude de phénomènes à l'interface substrat/échantillon

L'étude de processus d'adhésion au niveau de l'interface substrat/échantillon ou le suivi de phénomènes biologiques ayant lieu au niveau de la membrane des cellules nécessite d'avoir une bonne résolution axiale. Des récents développements en microscopie ont permis d'améliorer cette résolution pour pouvoir localiser le plan de provenance du signal collecté. Nous allons revenir succinctement sur les principaux développements technologiques qui permettent d'atteindre une résolution axiale de l'ordre de 100 nm. On peut ainsi distinguer deux catégories : les approches qui permettent *a priori* d'accéder à cette résolution axiale en différentes profondeurs de l'échantillon et celles qui, de part leur principe basé sur les ondes évancescentes ou les couplages type « champ proche », ne sont possibles que près de l'interface substrat/échantillon.

2.1 Microscopie sous illumination structurée

La microscopie sous illumination structurée SIM (*Structured Illumination Microscopy*) est une technique plein champ par laquelle la fluorescence va être modulée via un motif d'illumination [8]. En projetant un réseau sur l'échantillon, on va moduler spatialement la lumière incidente et introduire une fréquence porteuse dans le microscope. La multiplication de la fréquence du réseau par les fréquences spatiales élevées de l'échantillon va ainsi générer des franges de Moiré à la fréquence différence qui

sera plus basse. Cette technique permet de détecter les hautes fréquences spatiales de l'échantillon, qui étaient préalablement coupées par la fonction de transfert de l'objectif. On obtient également un sectionnement optique proche de celui du microscope confocal, étant donné que toute défocalisation (qui induit la perte du plan image du réseau) se traduira par une perte de la modulation. La coupe optique est obtenue en combinant trois images associées à trois positions différentes du réseau. Initialement développée par l'équipe de T. Wilson [8], cette approche a été ensuite reprise par M. Gustafsson afin d'augmenter la résolution latérale. L'acquisition de trois images dans trois directions (soit un total de neuf images), va permettre de doubler par cette méthode les fréquences spatiales accessibles [9] (Fig.1.4).

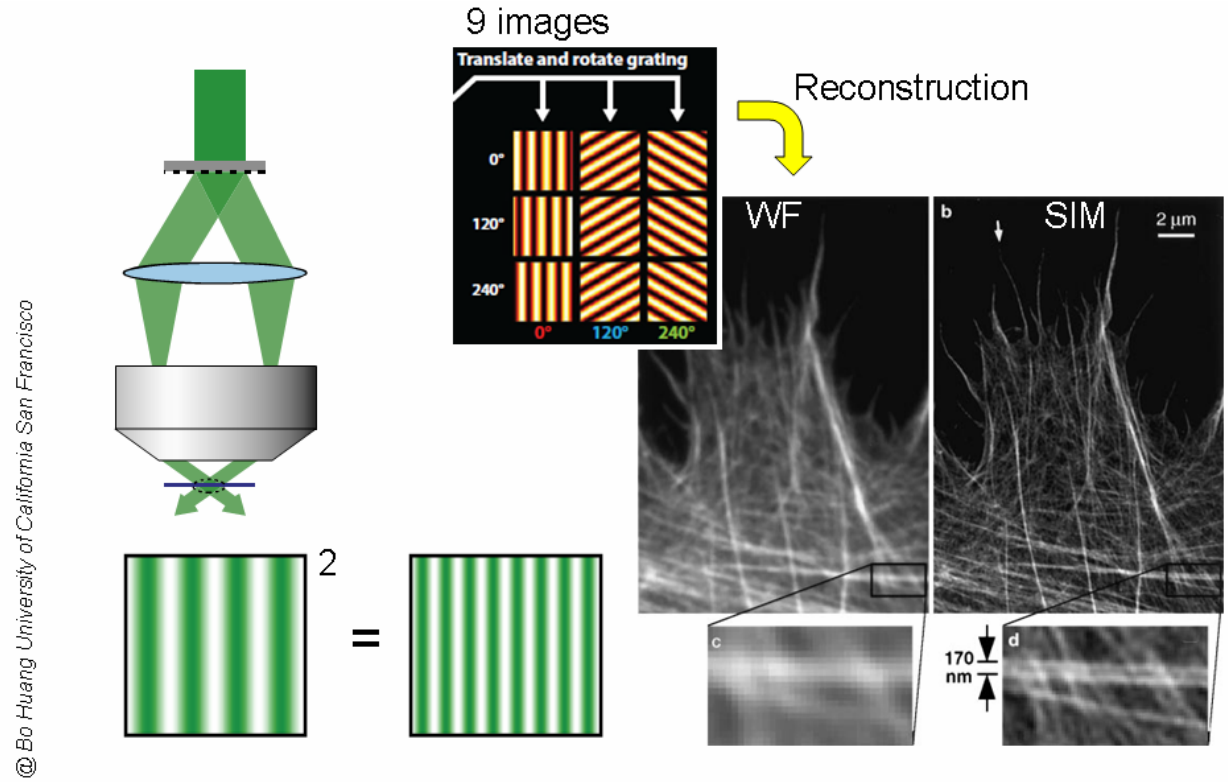


Fig.1.4 : Principe simplifié de la microscopie SIM et exemples d'images obtenues avec cette technique comparé à la microscopie en illumination plein champ classique. D'après [9].

Cette résolution peut encore être améliorée avec la microscopie sous illumination structurée non linéaire SSIM (*Saturated Structured Illumination Microscopy*). Cette technique a permis d'obtenir des résolutions latérales et axiales inférieures à 50 nm sur des billes [10]. Malgré l'aspect plein champ des microscopies sous illumination structurée et la facilité de leur implémentation, l'extraction et le traitement des données pour la reconstruction des images est complexe. De plus, une bonne photostabilité des échantillons est nécessaire dans le cas de la microscopie SSIM.

2.2 Microscopie 4Pi

La microscopie 4Pi est une autre techniques permettant d'améliorer la résolution axiale d'un microscope confocal traditionnel [11].

Brièvement, deux objectifs sont utilisés de part et d'autre de l'échantillon de telle sorte que leurs foyers soient superposés (Fig.1.5). Avec cette configuration, les ondes lumineuses arrivant sur l'échantillon vont interférer dans le volume focal commun aux deux objectifs et la figure d'interférence créée va délimiter alors le volume d'excitation. Ce principe est utilisé pour l'excitation et/ou la détection. Une résolution axiale jusqu'à quatre fois supérieure à celle obtenue en microscopie confocale peut être atteinte et de cinq à sept fois supérieure dans le cas où cette méthode est appliquée

pour l'excitation et pour la détection [11]. L'amélioration de la résolution axiale est notable avec cette technique cependant elle nécessite un alignement optique très précis et contraignant. De plus la microscopie 4Pi est applicable uniquement pour des échantillons biologiques peu épais. L'analogue de la microscopie 4Pi en configuration plein champ est la microscopie I^5M [12], [13].

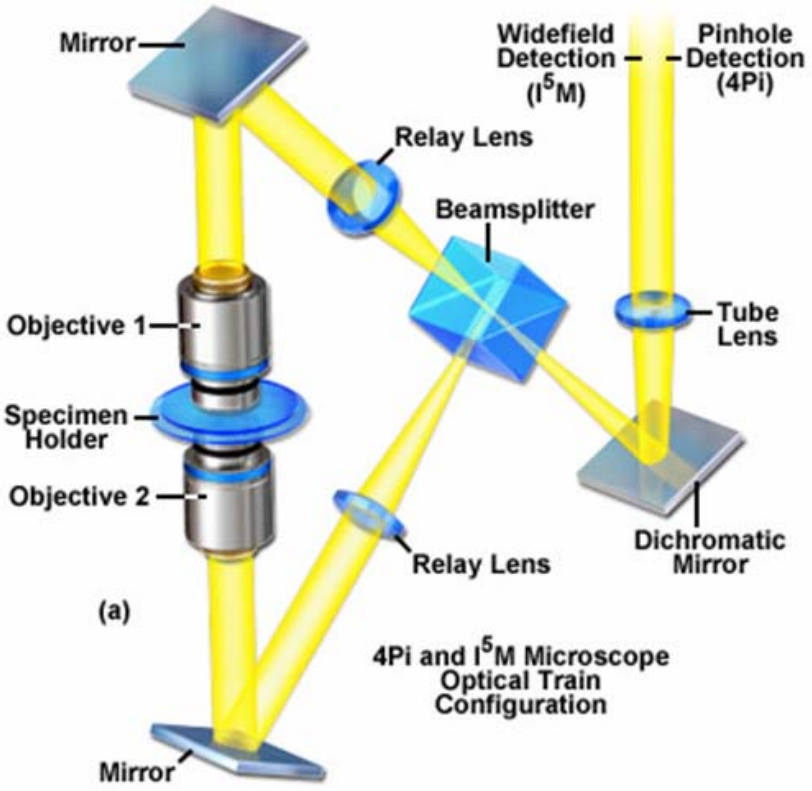


Fig.1.5 : Principe de la microscopie 4Pi et I^5M [http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/introduction.html].

2.3 Microscopie STED

La microscopie STED (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*) [14] permet d'accroître la résolution axiale en franchissant la barrière fixée par la diffraction. Cette technique est basée sur le contrôle des processus d'émission des fluorophores. Le faisceau d'excitation est superposé avec le faisceau STED de déplétion, qui va permettre par émission stimulée, de forcer la désexcitation des molécules situées en périphérie du volume focal (Fig.1.6). L'émission de fluorescence de certaines zones va ainsi être autorisée ou interdite suivant la mise en forme du faisceau STED (en forme de *doughnut*). On peut ainsi choisir de privilégier la résolution latérale et/ou axiale. En augmentant la puissance du faisceau STED par rapport au faisceau d'excitation, on diminue ainsi la taille de la tache centrale où l'émission de fluorescence est localisée et on augmente la résolution. Sur des systèmes biologiques, la résolution latérale est de l'ordre de 30 à 50 nm, l'amélioration de la résolution axiale reste limitée à 100-150 nm [15]. La principale limite de cette technique est le photoblanchiment des fluorophores. Afin de dépasser cette limite axiale, la microscopie STED a également été associée à la microscopie 4Pi, complexifiant très fortement le dispositif mais permettant d'offrir une résolution isotrope de 40-50 nm [16].

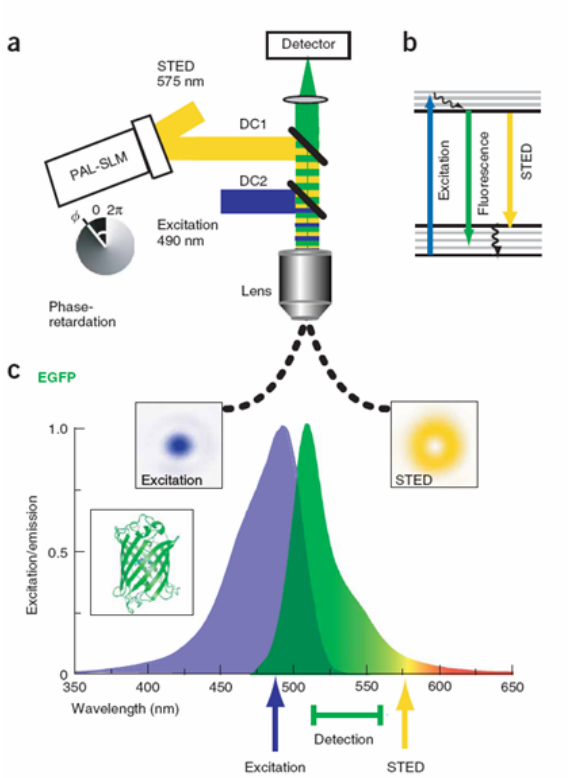


Fig.1.6 : Principe de la microscopie STED pour l'imagerie de la GFP [17].
(a) Schéma de principe du dispositif, le faisceau excitateur qui forme une tache d'Airy dans le plan d'observation est superposé avec le faisceau STED en forme de « doughnut », qui est produit en modifiant le front d'onde du faisceau à l'aide d'un modulateur acousto-optique (SLM) ou d'une lame de phase. Représentation de l'excitation, la fluorescence et l'émission stimulée dans le diagramme d'énergie (b) et en relation avec les spectres d'excitation et d'émission de la GFP (c).

2.4 Microscopie à onde évanescente

Il existe également des techniques de microscopie qui s'appuient sur la détection des ondes évanescentes. Parmi celles-ci il y a notamment la microscopie de champ proche à sonde locale SNOM (*Scanning Near-Field Optical Microscope*) qui confine l'onde évanescente dans les trois directions (< 20 nm). Des mesures avec des résolutions sous les 100 nm peuvent être obtenues avec cette méthode mais elle reste peu applicable à des échantillons biologiques et se limite pour l'instant à l'imagerie de cellules fixées et à l'imagerie de surface car les temps d'acquisitions sont longs [18].

La microscopie en réflexion totale interne (TIRF) utilise également les propriétés des ondes évanescentes, créées à l'interface lamelle/échantillon. Le confinement permet d'obtenir des résolutions axiales inférieures à 100 nm, la résolution latérale restant limitée par la diffraction. La microscopie TIRF est une technique d'imagerie plein champ qui est facilement compatible avec des applications biologiques. C'est la méthode que nous avons choisie pour observer des phénomènes ayant lieu à l'interface, avec une bonne résolution axiale. Nous reviendrons plus en détail sur le principe de la microscopie TIRF dans le chapitre II.

Récemment, la microscopie STED a été couplée au TIRF pour améliorer le confinement axial. Cela permet notamment de réduire les processus de photoblanchiment et de photodommages [19].

2.5 Techniques de superlocalisation

Les développements actuels montrent tout l'intérêt de la résolution axiale offerte par le TIRF. En effet, les techniques de superlocalisation de molécules, nécessitant un faible bruit de fond, ont très

rapidement adopté cette approche. La microscopie TIRF a ainsi été couplée avec les techniques PALM/STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [5]. Ces techniques de superlocalisation utilisent des fluorophores (protéines ou colorants organiques) photoactivables ou *photoswitchables,* pour permettre l'émission d'une faible fraction des fluorophores et ainsi distinguer les signaux individuels pour les localiser précisément. L'acquisition de plusieurs milliers d'images est nécessaire pour avoir une bonne précision sur la localisation des molécules, ce qui a longtemps limité ces techniques à l'observation d'échantillons fixés. On peut ainsi localiser la molécule avec une précision latérale de 30 nm. Les évolutions bicouleurs et 3D sont également possibles (résolution axiale entre 50 et 80 nm) et rendent possibles l'imagerie de plusieurs fluorophores et la colocalisation de ceux-ci avec une bonne précision de l'ordre d'une trentaine de nanomètres [20].

2.6 Microscopie supercritique

Une alternative intéressante à la microscopie TIRF, est la microscopie supercritique appelée également SAF pour *Supercritical Angle Fluorescence*. Elle permet grâce à un filtrage des lobes d'émission des fluorophores, de pouvoir atteindre une résolution axiale de l'ordre de 100 nm à partir d'une configuration d'épifluorescence classique. La sélectivité spatiale est issue non pas d'un confinement à l'excitation mais d'une sélectivité à la collection de l'émission de fluorescence de l'échantillon. En effet, les directions d'émission des fluorophores dépendent de leur distance à la surface de la lamelle de verre (Fig.1.7). Les fluorophores peuvent être assimilés à des nano-antennes possédant des composantes électromagnétiques évanescentes lorsque leur environnement immédiat est homogène. Cependant, lorsqu'une interface est présente à moins de quelques dizaines de nanomètres, une partie de ces composantes devient propagative et ce signal est alors émis dans le verre dans des directions au-delà de l'angle critique. Ainsi, alors que l'émission sous-critique est identique quelle que soit la distance fluorophore/verre, seuls les fluorophores situés au voisinage immédiat de l'interface possèdent une telle émission supercritique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 34% de l'émission totale [21] et environ 50% de la fluorescence émise dans le verre [22].

La microscopie SAF présente de nombreux avantages tels qu'une baisse significative du bruit de fond dû à la diffusion de la lumière dans les milieux biologiques, un choix plus important pour les sources d'éclairage (qui offrent un champ d'observation plus homogène et un coût de mise en œuvre réduit). Initialement, l'idée a été proposée par Axelrod en association avec l'utilisation d'objectifs à très grande ouverture numérique (ON = 1,65) [23]. Les principaux développements ont ensuite été effectués par l'équipe de Ruckstuhl sur des microscopes à balayage avec des objectifs paraboliques spécifiques [24], [25]. Un développement est actuellement en cours dans l'équipe pour une approche plein champ et devrait donc permettre d'obtenir simultanément les images d'épifluorescence et de SAF, facilitant le suivi de processus membranaires. Ce travail est une collaboration avec l'Institut Langevin et fait l'objet de la thèse de Thomas Barroca.

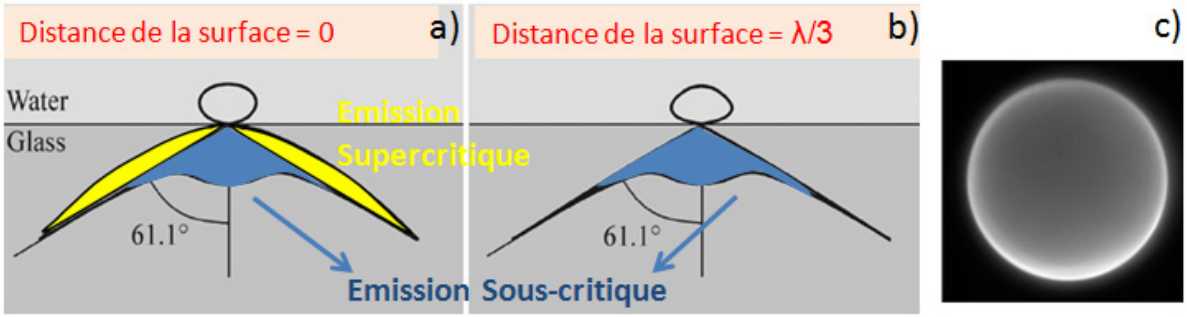


Fig.1.7 : Principe de la microscopie supercritique. Elle repose sur le filtrage des lobes d'émission, lorsque le fluorophore est proche de la surface (distance inférieure à λ/3) (a). L'émission de fluorescence peut alors se faire aux angles supercritiques (a), au-delà de cette distance, seule l'émission sous-critique est présente (b). L'émission supercritique peut être identifiée en filtrant sélectivement dans le plan focal arrière de l'objectif (c).

Comme nous venons de le voir, de nombreux développements technologiques ont été effectués pour permettre d'étudier des phénomènes aux interfaces avec une bonne résolution axiale sous les 150 nm. La plupart de ces techniques peuvent être couplées à la mesure de durée de vie de fluorescence (FLIM) pour ajouter un contraste supplémentaire comme avec le microscope STED-FLIM [26] ou la microscopie TIRFLIM [27]. Etant donné que les dispositifs de détection diffèrent, suivant la configuration plein champ ou à balayage, nous allons maintenant revenir sur les techniques disponibles pour faire de l'imagerie de durée de vie de fluorescence.

3 Microscopie de fluorescence résolue en temps

L'imagerie de durée de vie de fluorescence ou FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) est un outil spectroscopique très efficace en physique et en biologie [28-30]. En effet les mesures sont indépendantes de la concentration et de l'intensité et vont renseigner sur l'environnement du fluorophore tel que le pH [31], l'indice de réfraction [32] ou la viscosité [33]. En absence de marquage fluorescent, le contraste pourra être fourni en utilisant le signal d'autofluorescence inhérent à la plupart des échantillons biologiques, ce qui a un intérêt du point de vue clinique par exemple dans le traitement de certains cancers [34]. Comme nous le verrons par la suite, en biologie cellulaire, l'imagerie FLIM est communément utilisée pour suivre des interactions entre protéines par l'intermédiaire du FRET [35], qui est une technique précise pour suivre ces interactions.

Si l'on considère un échantillon avec plusieurs fluorophores présents ayant des temps de vie de fluorescence différents, et suivant chacun un modèle de déclin mono-exponentiel, le déclin de fluorescence est alors multi-exponentiel de la forme suivante :

$$F(t) = \sum_i a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \tag{1.7}$$

où a_i représente l'amplitude des espèces ayant la durée de vie de fluorescence τ_i. L'amplitude est fonction de l'intensité et de la concentration de chaque espèce. Les mesures de durée de vie de fluorescence vont pouvoir être faites soit dans le domaine temporel soit dans le domaine fréquentiel.

3.1 Domaine temporel

Dans le domaine temporel, le déclin de fluorescence est obtenu directement après excitation de l'échantillon avec une impulsion très courte devant la durée de vie de fluorescence mesurée (soit inférieure à la nanoseconde) par une méthode de comptage de photon unique corrélé en temps ou par une méthode d'échantillonnage. La première méthode de comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC) repose sur l'acquisition d'une image pixel par pixel par balayage et utilise des détecteurs non imageants (ex : photomultiplicateur). La deuxième méthode correspond à la mesure de durée de vie de fluorescence en plein champ et utilise des détecteurs imageurs [36]. Nous allons décrire succinctement ces deux techniques.

3.1.1 Méthode de comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC)

La méthode de TCSPC est une technique qui enregistre les instants d'arrivée de photons uniques après l'impulsion excitatrice. Elle repose sur le principe selon lequel pour des signaux de faible intensité, avec un fort taux de répétition (cadence supérieure au MHz), l'intensité de la lumière est tellement faible que la probabilité de détecter un photon sur une période est inférieure à 1. Dans ces conditions, on s'affranchit de la possibilité de détecter plusieurs photons dans une période du signal. Il suffit alors d'enregistrer les photons et leur instant d'arrivée par rapport aux périodes du signal pour construire l'histogramme des instants d'arrivée de photons (Fig.1.8). On récupère ainsi le déclin de fluorescence associé. Il est nécessaire de bien se placer dans ces conditions sinon la présence de plus d'un photon par période induit une sous-estimation de la durée de vie de fluorescence mesurée.

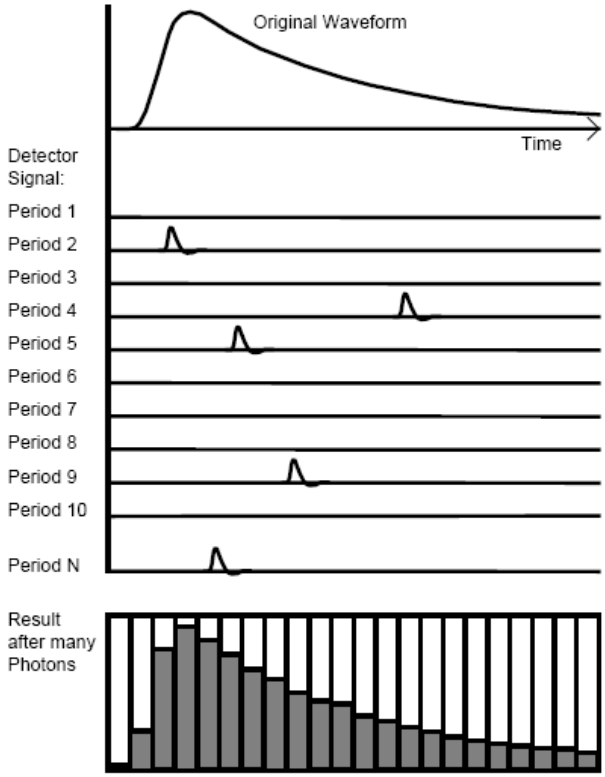


Fig.1.8: Principe de la méthode de comptage de photon unique corrélé dans le temps.
En haut sont représentés le déclin de fluorescence obtenu au cours du temps, puis les dix premières impulsions et les photons détectés. Pour certaines impulsions, aucun photon n'est détecté.
En bas est représenté l'histogramme de la distribution des photons au cours du temps [37].

Les enregistrements de durée de vie de fluorescence effectués avec la méthode TCSPC permettent d'obtenir une très bonne résolution temporelle, qui dépend toutefois de la fonction de réponse instrumentale du détecteur (typiquement entre 40 et 200 ps). Plusieurs lignes TCSPC peuvent être utilisées en parallèle pour améliorer la vitesse d'acquisition. Le développement de systèmes multidimensionnels qui enregistrent de manière simultanée les densités de photons pour différentes longueurs d'onde ou les coordonnées dans l'image sont d'autres avancées dans ce domaine qui rendent ces dispositifs très attractifs.

La technique TCSPC permet donc de faire des mesures de durée de vie de fluorescence avec une grande précision, un très bon rapport signal sur bruit et une grande reproductibilité. En contrepartie les temps d'acquisition et les statistiques de comptage nécessitent plusieurs minutes pour obtenir un signal suffisant et un ajustement fiable. Cela reste quand même une technique très utilisée pour faire des mesures de durée de vie de fluorescence avec un microscope confocal [38] ou multiphoton [39].

La vitesse d'acquisition et les performances peuvent également être améliorées par l'utilisation de matrices de photodiode à avalanche SPAD (*Single Photon Avalanche Diode*), qui offrent une résolution de l'ordre de la picoseconde [40]. De plus, les récents développements techniques ont permis d'accroître la rapidité des acquisitions par l'utilisation notamment de plusieurs faisceaux pour le balayage, la mise en place de *spinning disks* [41] ou le développement de microscopes multiphotons multipoints [42], la réduction des temps d'acquisition étant un paramètre crucial pour étudier des interactions dynamiques en cellules. Ces dispositifs utilisent des détecteurs imageants que nous allons décrire dans la suite.

3.1.2 Mesures de durée de vie de fluorescence avec un intensificateur à déclenchement périodique

L'alternative dans le domaine temporel est l'imagerie plein champ, utilisant des intensificateurs (*time-gated FLIM*). Concrètement, on excite l'échantillon avec une impulsion très courte, on va ensuite échantillonner le déclin de fluorescence en acquérant des images à différents instants après l'impulsion (Fig.1.9). Ces acquisitions sont effectuées par l'intermédiaire de « portes temporelles » générées par un intensificateur à déclenchement périodique [36], [43]. Une ligne à retard permet de positionner ces « portes temporelles » à différentes positions du déclin de fluorescence.

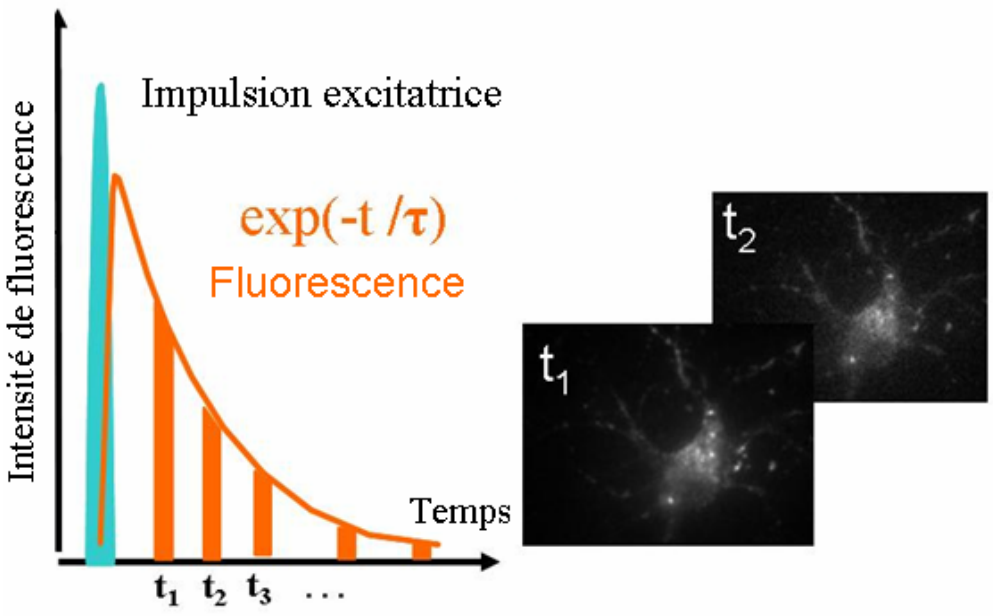


Fig.1.9 : Principe du FLIM dans le domaine temporel avec une détection à déclenchement contrôlé. Pour une première impulsion, un délai t_1 est appliqué entre l'impulsion et l'acquisition ; puis pour une seconde impulsion un délai t_2 est appliqué entre l'impulsion et l'acquisition, etc…

L'intensificateur à déclenchement périodique ou HRI (*High Rate Imager*) est un système d'imagerie permettant d'amplifier un signal lumineux émis à un instant spécifique après une référence (signal d'horloge) avec un temps d'intégration très court. Ce détecteur est composé d'une photocathode sur laquelle est projetée la figure lumineuse dont on souhaite acquérir une image, d'une galette de microcanaux qui va amplifier le signal et d'un écran à phosphore où l'image amplifiée de la figure est formée (Fig.1.10). L'intensificateur est synchronisé sur un signal d'horloge (tel que le train d'impulsions du laser d'excitation). La formation des portes temporelles ultra-rapides (200 ps à quelques nanosecondes) est réalisée par l'application d'une tension sur un temps très court, soit sur la photocathode soit sur la « gating mesh » (Fig.1.10). Dans le chapitre II, nous verrons que cela peut avoir une incidence sur la résolution spatiale associée à l'intensificateur. L'utilisation d'une caméra CCD est indispensable pour acquérir une image de l'écran à phosphore et enregistrer l'image amplifiée obtenue.

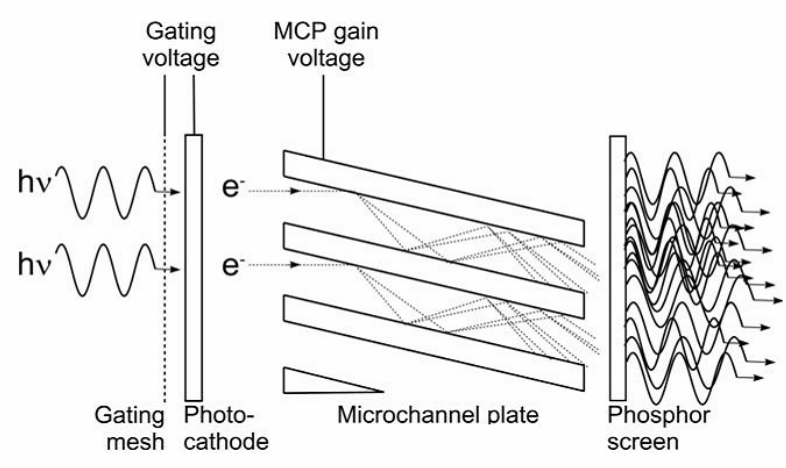


Fig.1.10: Schéma illustrant le fonctionnement d'un intensificateur d'image [44].

Le détecteur sera ainsi actif uniquement aux temps choisis et pendant une durée correspondant à la largeur des portes temporelles. Ce dispositif est très pratique car ajustable en fonction du système étudié. On peut ainsi jouer sur le nombre de portes temporelles, sur leur largeur en fonction du signal de fluorescence, du temps d'acquisition souhaité, etc… Cette configuration permet d'acquérir une image de durée de vie de fluorescence en plein champ, sans balayage. La vitesse d'acquisition est donc très rapide étant donné que les acquisitions sont faites en parallèle sur tous les pixels. Des mesures de durée de vie de fluorescence ont ainsi été rapportées avec une cadence de 100 Hz dans le suivi de flux calciques dans des myocytes de rat [45]. En revanche, ce gain en rapidité d'acquisition est perdu en sensibilité et en précision par rapport à la technique TCSPC. En effet, la résolution temporelle est de l'ordre d'une dizaine de picoseconde en FLIM plein champ contre quelques picosecondes par la méthode TCSPC.

De plus, cette technique nécessite un signal de fluorescence suffisamment intense car elle s'appuie sur une image directe du signal obtenu sur l'écran à phosphore par l'intermédiaire d'une caméra. Il est donc parfois nécessaire de moyenner les images au cours du déclin pour accroître le rapport signal sur bruit et/ou de faire du *binning* sur l'image (fusionner des pixels 2 par 2 ou 4 par 4).

La résolution spatiale est également détériorée par l'écran à phosphore de l'intensificateur. Concernant la perte en terme de résolution temporelle, le développement de caméras à balayage de fente (*streak camera*) permet d'y remédier. Ces systèmes permettent ainsi de faire des mesures de durée de vie de fluorescence avec une grande rapidité et les déclins sont facilement visualisables [46] mais ce type de dispositif demeure très cher et le balayage s'effectue uniquement par lignes.

3.2 Domaine fréquentiel

Les premières mesures de durée de vie de fluorescence ont d'abord été faites dans le domaine fréquentiel dans les années 20 [47] et ont permis de caractériser des déclins de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde.

Pour cette technique, la lumière excitatrice est modulée sinusoïdalement à haute fréquence typiquement entre 10-100 MHz. Par conséquent, l'émission de fluorescence qui représente la réponse du système, va être modulée à la même fréquence. En raison de la durée de vie de fluorescence non nulle de n'importe quel fluorophore, l'émission modulée a un retard de phase d'un angle Φ par rapport à l'excitation. Le degré de modulation M (définie par l'amplitude de la composante sinusoïdale par rapport à l'offset) sera plus petit dans le cas de l'émission de fluorescence. Il est défini par la relation F_ω / F_0 par rapport au degré de modulation pour l'excitation de fluorescence définie par E_ω / E_0 (Fig.1.11). En mesurant la variation du degré de modulation et le retard de phase entre l'excitation et

le signal d'émission de fluorescence, pour différentes fréquences, on peut extraire les constantes de temps du système.

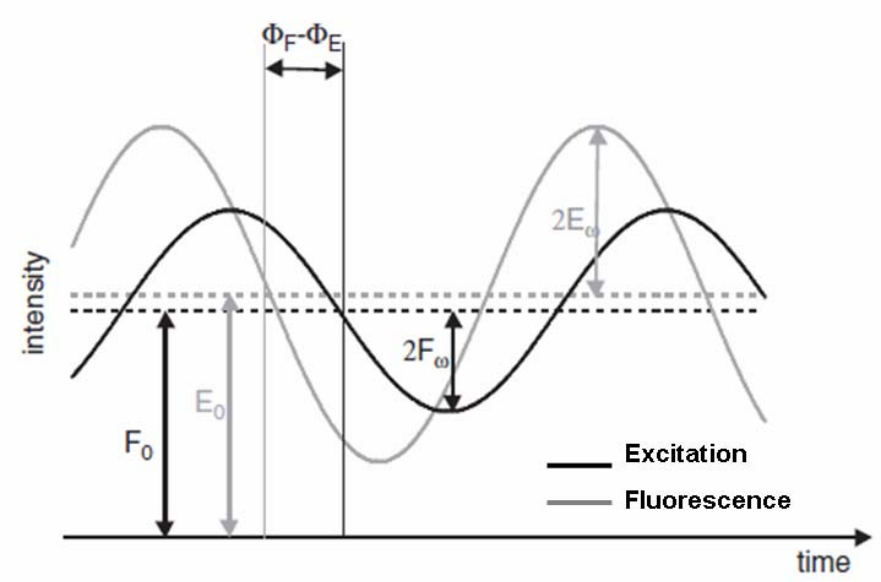


Fig.1.11: Profils au cours du temps de l'excitation et de l'émission de fluorescence obtenus dans le domaine fréquentiel. E_0 et F_0 sont les amplitudes de l'offset de l'excitation et du signal de fluorescence alors que E_ω et F_ω représentent la moitié des amplitudes de modulation. Le déphasage entre les deux signaux est donné par (Φ_F - Φ_E) [48].

La lumière excitatrice modulée sinusoïdalement peut s'écrire sous la forme :

$$E(t) = E_0 + 2E_\omega \cos(\omega t + \phi^E) \tag{1.8}$$

où E_0 est l'offset du signal, E_ω représente la moitié de l'amplitude de la modulation et ϕ^E est une constante de phase. En considérant un signal de fluorescence avec un déclin mono-exponentiel, la réponse du système à une excitation du type $E(t)$, oscillant à la pulsation $\omega = 2\pi f$ sera donnée par l'expression :

$$F(t,r) = F_0(r) + 2F_\omega(r)\cos(\omega t + \phi^F(r)) \tag{1.9}$$

où r représente la position du pixel choisi, $F_\omega(r)$ est la moitié de l'amplitude de la composante sinusoïdale et $\phi^F(r)$ est une constante de phase.

Il a été montré que dans le cas où le déclin de fluorescence est mono-exponentiel avec une durée de vie de fluorescence $\tau(r)$, le déphasage entre l'excitation et l'émission de fluorescence à la position choisie est relié à la durée de vie de fluorescence à cette position par la relation [49]:

$$\phi(r) = \arctan(\omega\tau(r)) \tag{1.10}$$

De plus, le degré de modulation de l'émission de fluorescence est réduit d'un facteur $m(r)$ donné par la relation :

$$m(r) = \frac{F_\omega(r)/F_0(r)}{E_\omega/E_0} \tag{1.11}$$

Ce facteur est également lié à la durée de vie de fluorescence $\tau(r)$ par l'équation :

$$m(r) = \frac{1}{\sqrt{1+(\omega\tau(r))^2}} \tag{1.12}$$

Ainsi dans des cas simples de déclins mono-exponentiels, la mesure du déphasage $\phi(r)$ ou du degré de modulation $m(r)$ vont permettre de déduire la durée de vie de fluorescence associée à chaque pixel de l'image.

Alors que dans le domaine temporel, une source laser impulsionnelle est nécessaire pour l'excitation, dans le domaine fréquentiel, un laser continu et un module acousto-optique sont suffisants. Une LED modulée peut également être utilisée [50].

Concernant les systèmes de détection, les outils à disposition dans le domaine fréquentiel sont identiques à ceux utilisés dans le domaine temporel (intensificateurs plein champ, système à balayage, etc…). Le déphasage et le degré de modulation sont mesurés de manière relative par rapport à des mesures faites sur des échantillons standards, calibrés, de durée de vie de fluorescence connue. Ces paramètres peuvent être déterminés par une détection hétérodyne ou homodyne [51]. Brièvement, dans le cas de l'utilisation d'intensificateur, la détection hétérodyne est réalisée en modulant le gain de l'intensificateur d'image à la fréquence $f + \Delta f$ lorsque la fluorescence est modulée à la fréquence f. Le signal de fluorescence résultant est alors modulé à la fréquence Δf qui contient les informations sur le déphasage et sur le degré de modulation du signal originel haute fréquence. Pour déterminer ces deux paramètres en tout point de l'image, le signal de fluorescence est projeté sur la photocathode de l'intensificateur d'image modulé à $f + \Delta f$. Un mélange de fréquence va alors se produire entre le gain de l'intensificateur qui oscille à $f + \Delta f$ et le photocourant qui oscille selon f. On récupère ainsi le signal oscillant à Δf et les informations sur le degré de modulation et le déphasage. Dans le cas d'une détection homodyne, la fréquence de modulation de la lumière excitatrice est identique à celle du gain de l'intensificateur d'image.

Les mesures de durée de vie de fluorescence effectuées dans le domaine fréquentiel présentent donc certains avantages tels que la source d'excitation non impulsionnelle (peu coûteuse) et par conséquent l'absence de réponse impulsionnelle de la détection. Cependant en contrepartie, la détection doit être modulée, ce qui augmente le coût du dispositif. De plus, bien que ce montage soit facile à implémenter, l'analyse des données est complexe et une mesure de référence est constamment nécessaire.

Les différentes techniques utilisées pour faire des mesures de durée de vie de fluorescence ayant été présentées, nous allons maintenant nous intéresser aux méthodes permettant d'analyser ces mesures, en nous restreignant au domaine temporel dans lequel nous avons choisi d'effectuer nos mesures de durée de vie de fluorescence.

3.3 Analyses des mesures

3.3.1 Détermination de la durée de vie de fluorescence par ajustement mono ou multi-exponentiel

Les techniques d'analyse « classiques » utilisent des ajustements de type exponentiel pour extraire la durée de vie de fluorescence du déclin d'intensité obtenu. En général sur les systèmes TCSPC, on va extraire le déclin en choisissant une région d'intérêt plutôt que pixel par pixel, étant donné le faible nombre de photons. Une autre méthode consiste à mesurer les durées de vie de fluorescence pour chaque pixel de l'image et à calculer ensuite leur moyenne. Cette technique nécessite d'avoir un nombre suffisant de photons pour chaque pixel ; elle est donc plus facilement applicable pour les détections FLIM utilisant un intensificateur. En fonction des espèces présentes, on pourra utiliser un ajustement mono ou multi-exponentiel, qui s'appuit sur des méthodes d'ajustements non linéaires tels que les ajustements par la méthode des moindres carrés (algorithme de Levenberg-Marquardt) [52]. Dans le cas où une seule espèce est présente, un ajustement mono-exponentiel est utilisé.

La mesure de la durée de vie moyenne permet d'avoir une bonne estimation de la durée de vie de la zone d'intérêt avec une bonne précision, étant donné que par cette opération on va augmenter le rapport signal sur bruit. Cependant, certaines informations de durée de vie locale peuvent être perdues. C'est pour cela qu'il est intéressant de connaître la distribution des durées de vie mais celle-ci sera

accessible uniquement dans le cas où le calcul de la durée de vie est effectué pour chaque pixel de l'image. Toutefois, il faut rester vigilant par rapport aux durées de vie déterminées pour chacun des pixels car si ces mesures peuvent rendre compte des hétérogénéités de l'échantillon, il est souvent difficile d'extraire le signal utile du bruit de mesure. La mesure de la durée de vie moyenne offre donc un temps de traitement court et permet d'avoir rapidement une bonne estimation du temps de vie de fluorescence.

Etant donné que les déclins de fluorescence des molécules dans beaucoup de cas ne sont pas purement mono-exponentiels (lorsque plusieurs espèces fluorescentes sont présentent ou lorsque des interactions entre molécules ont lieu notamment), d'autres ajustements plus complexes, de type multi-exponentiels (équation (1.7)), sont possibles. L'extraction des informations pour chaque fluorophore peut alors devenir très complexe. Dans ces cas-là, l'analyse peut être facilitée par l'association d'une mesure spectrale. L'imagerie de durée de vie résolue spectralement (SLIM ou SFLIM) [53] ou multispectrale [54], [55] enregistre pour chaque pixel de l'image le spectre et la durée de vie de fluorescence. Cela peut permettre l'identification de différentes espèces avec des durées de vie différentes et l'imagerie de FRET [53].

Comme nous l'avons vu, pour extraire les durées de vie de fluorescence, on utilise le plus souvent un ajustement mono-exponentiel alors que le système possède en général une distribution beaucoup plus complexe de durée de vie avec de multiples composantes. L'utilisation d'ajustement multi-exponentiel pour déterminer les durées de vie de fluorescence et leurs amplitudes associées est alors possible. Cependant, ces modèles présentent peu de robustesse, car les paramètres d'amplitude et de durée de vie de chaque espèce sont liés et il est ainsi difficile d'extraire de façon indépendante la contribution de chacune des composantes. Pour pallier aux limites des analyses avec ajustement, des méthodes ont été développées pour simplifier le traitement des images obtenues. La représentation polaire (ou *phasor*) ainsi que la méthode de FLIM sans ajustement sont alors des alternatives possibles.

3.3.2 Détermination de la durée de vie de fluorescence sans ajustement

Une technique d'analyse basée sur la « représentation polaire » (*polar plot*) ou *phasor* a été développée et appliquée dans le domaine fréquentiel [56]. Cette méthode permet une analyse simple, graphique et rapide des mesures de déphasage et de modulation effectuées dans le domaine fréquentiel. Elle est particulièrement adaptée dans le cas où l'on image des échantillons présentant un mauvais rapport signal sur bruit ou dans le cas de déclins multi-exponentiels. Cette représentation ne se limite pas au domaine fréquentiel ; les données acquises dans le domaine temporelle par la méthode TCSPC ou en utilisant un intensificateur, peuvent être transposées dans le domaine fréquentiel par transformée de Fourier.

Brièvement, la technique de représentation polaire permet d'obtenir une représentation spatiale de l'histogramme des temps de vie de chaque pixel. Les valeurs des transformées en sinus et en cosinus sont représentées dans le graphique polaire comme un histogramme à deux dimensions. Chaque pixel de l'image va donner un point dans la représentation polaire et inversement. La distance entre ce point et l'origine va correspondre à son degré de modulation $M(\tau)$ et l'angle entre cette droite et l'axe des abscisses donne la phase associée $\varphi(\tau)$, qui sont tous les deux fonction de la durée de vie de fluorescence (Fig.1.12). Chaque espèce peut être identifiée par sa position dans la représentation polaire et des caractéristiques peuvent être déduites sur sa durée de vie de fluorescence. Ainsi la position sur le demi-cercle (Fig.1.12) correspondra à une espèce ayant un déclin de durée de vie de fluorescence mono-exponentiel. Tout point situé à l'intérieur du demi-cercle aura un déclin multi-exponentiel et le poids de chaque composante peut être déterminé par analyse graphique [56].

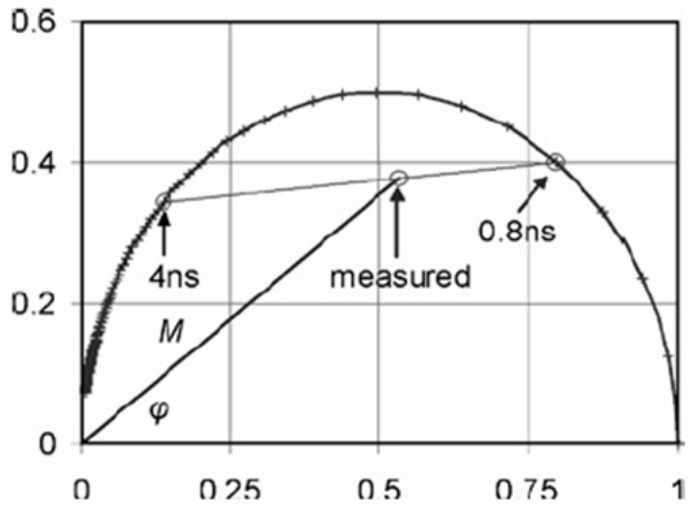


Fig.1.12: Simulation de la représentation polaire dans le plan complexe d'une mesure de durée de vie de fluorescence [56]. *La durée de vie a deux composantes. Les durées de vie augmentent lorsque l'on parcourt ce demi-cercle de la droite vers la gauche en partant du point (1,0) qui représente une durée de vie nulle au point (0,0) qui représente une durée de vie infinie.*

Cette technique permet ainsi de savoir si les déclins sont mono ou multi-exponentiel sans calcul de durée de vie de fluorescence, la fraction moléculaire de chaque fluorophore dans le cas où plusieurs fluorophores sont présents peut être extraite pour chaque pixel de l'image. Cette analyse a de plus permis de mettre en évidence de manière quantitative du FRET sur des données accumulées par la méthode TCSPC [57]. Les efficacités de FRET ainsi que les proportions de donneur et d'accepteur de FRET qui ne sont pas en interaction, peuvent également être extraites Cette approche polaire permet ainsi de simplifier l'analyse des images FLIM, tout en permettant d'avoir une vision d'ensemble des processus affectant la durée de vie de fluorescence pour chaque pixel.

Une autre approche qui permet de s'affranchir de l'ajustement exponentiel est la méthode de FLIM « rapide » sans ajustement qui va permettre d'obtenir la durée de vie moyenne de l'échantillon sans utiliser d'ajustement exponentiel et sans qu'aucune hypothèse ne soit ainsi faite sur l'évolution du déclin de fluorescence.

La durée de vie de fluorescence moyenne est définie par la relation :

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int t \times i(t)dt}{\int i(t)dt} \tag{1.13}$$

Dans le domaine temporel en utilisant un système de portes temporelles, la durée de vie moyenne peut être approximée par la relation :

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \Delta t_i I_i}{\sum_i I_i} \tag{1.14}$$

où Δt_i représente le délai entre le temps d'arrivée de l'impulsion et l'acquisition de la $i^{\text{ème}}$ image, I_i représente l'intensité de la $i^{\text{ème}}$ image.

Ces mesures FLIM sans ajustement ont ainsi été appliquées avec un système avec cinq portes temporelles de 2 ns de large [58]. Cette technique est particulièrement adaptée pour effectuer des mesures de FRET quantitatives et déterminer la fraction minimale de donneur en interaction mf_D [58], [59]. Nous reviendrons sur cette méthode par la suite dans la partie concernant le suivi d'interaction entre protéines.

4 Suivi d'interactions moléculaires par imagerie de FRET

Les interactions protéiques sont impliquées dans de nombreux mécanismes qui régulent les fonctions cellulaires. Des méthodes en biologie moléculaire ont été développées pour sonder ces interactions telles que les méthodes d'immunoprécipitation. Pour ces techniques, les protéines doivent être extraites de leur environnement et les interactions doivent être des liaisons fortes pour que les protéines soient précipitées ensemble (types liaisons covalentes). De plus, on ne peut pas effectuer un suivi dynamique de l'interaction.

L'imagerie des interactions entre protéines peut permettre une détection directe avec une perturbation minimale de l'environnement. De nombreuses stratégies ont ainsi été développées pour suivre ces interactions en cellules. La plus courante est l'imagerie de FRET qui peut être implémentée de différentes façons comme nous allons le voir par la suite.

4.1 FRET : Principe et conditions

Le FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) est un processus photophysique qui implique un transfert non radiatif d'énergie de l'état excité d'un fluorophore donneur (D) vers un fluorophore accepteur (A) (Fig.1.13). Ce dernier va émettre un photon à une longueur d'onde plus longue. Aucun photon n'est impliqué dans ce transfert, il s'agit d'une interaction du type dipôle-dipôle dans laquelle le dipôle de l'accepteur résonne avec les oscillations du champ électrique du donneur [60]. On parle également parfois de RET pour *Resonance Energy Transfer* [61]. Plusieurs conditions doivent être remplies pour qu'il puisse y avoir transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur :

- la proximité entre le donneur et l'accepteur (distance inférieure à 10 nm).
- l'orientation spatiale du dipôle d'émission du donneur et du dipôle d'absorption de l'accepteur (pris en compte dans le facteur d'orientation de dipôles κ^2).
- un recouvrement spectral suffisant entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur [62].

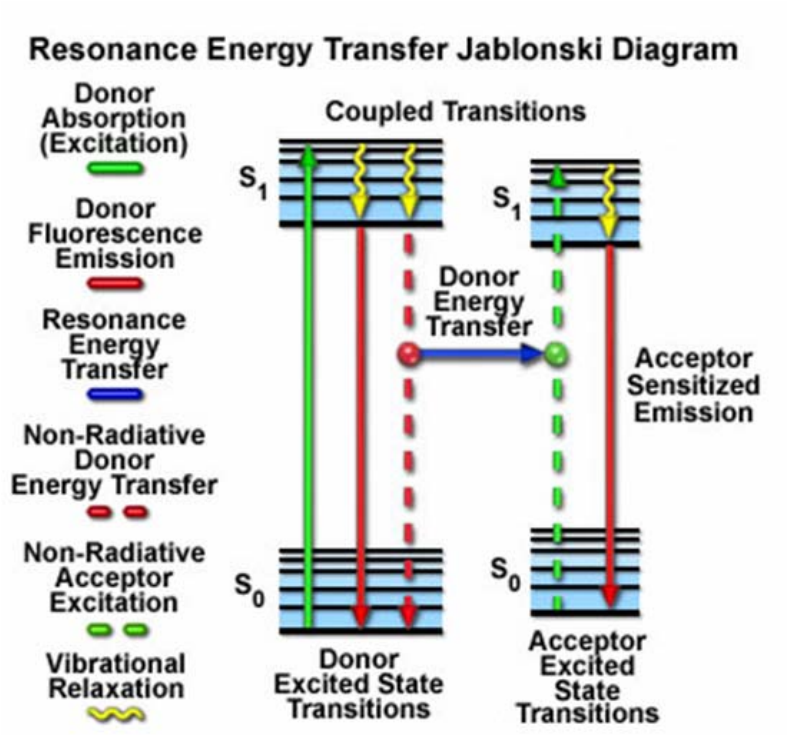


Fig.1.13: Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié schématisant le processus de FRET [http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html].

Lorsque le donneur et l'accepteur sont deux fluorophores différents, on parle d'hétéroFRET alors que s'ils sont identiques, on parle d'homoFRET. Dans le cas de l'hétéroFRET le transfert du donneur à l'accepteur est beaucoup plus rapide que de l'accepteur au donneur, ce qui est lié à un recouvrement spectral plus important entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur, par rapport au recouvrement entre le spectre d'émission de l'accepteur et le spectre d'absorption du donneur. Ainsi, le transfert d'énergie dans le cas de l'hétéroFRET est considéré comme étant unidirectionnel. En revanche, dans le cas de l'homoFRET, les deux fluorophores étant identiques et ayant les mêmes spectres, le transfert peut avoir lieu dans les deux sens entre donneurs et accepteurs. Un équilibre dynamique s'installe alors où l'énergie peut migrer entre donneur et accepteur, c'est pourquoi l'homoFRET est également appelé *energy migration FRET* (emFRET).
Le taux de transfert d'énergie est décrit par $k_{FRET}(r)$:

$$k_{FRET}(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \tag{1.15}$$

où r est la distance entre le donneur et l'accepteur. τ_D est la durée de vie du donneur en absence de transfert d'énergie et R_0 est la distance de Förster pour laquelle l'efficacité de transfert est de 50%. L'efficacité du transfert d'énergie pour une simple paire donneur-accepteur à une distance fixée est :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \tag{1.16}$$

Les distances de Förster étant comparables en taille par rapport aux macromolécules biologiques (30 à 60 Å), le FRET est un moyen de mesurer des distances entre le donneur et l'accepteur [63]. On constate que plus R_0 sera grand plus la probabilité d'avoir du FRET entre les fluorophores sera importante. R_0 dépend de plusieurs paramètres reliés par la relation suivante :

$$R_0 = 0{,}211 \times \left[\kappa^2 n^{-4} Q_D J\right]^{\frac{1}{6}} \tag{1.17}$$

κ^2 : Facteur d'orientation du dipôle, fonction du moment de transition de l'émission du donneur et du moment de transition de l'absorption de l'accepteur (souvent égal à 2/3).
Q_D : Rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence d'accepteur
n : Indice de réfraction
J : Intégrale de recouvrement spectral qui représente le degré de recouvrement entre les spectres de fluorescence du donneur et d'absorption de l'accepteur.
Ainsi pour le couple GFP/mCherry R_0 vaut 47 Å [58] et pour le couple CFP/YFP, il vaut 49 Å [64].

Ainsi, pour que du FRET ait lieu, le choix du couple de fluorophores utilisés est essentiel. Il faut que les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur se recouvrent pour que le transfert d'énergie soit possible.

Le transfert de FRET peut être mis en évidence de différentes manières telles que la diminution de la fluorescence du donneur, l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur ou bien encore un raccourcissement de la durée de vie de fluorescence du donneur, comme nous allons le voir par la suite. L'imagerie de FRET va rendre compte d'une proximité entre les molécules (< 10 nm). Cette proximité est souvent assimilée à une interaction probable. Cependant l'imagerie de FRET seule ne peut pas être la preuve d'une interaction entre deux molécules. Des expériences « contrôle » en biologie moléculaire par exemple, si l'on s'intéresse à l'interaction entre des protéines (immunoprécipitation, etc…), doivent appuyer cette hypothèse. Les fluorophores utilisés et leurs sites de fixation au niveau des molécules d'intérêt doivent également être bien contrôlés. Par ailleurs, l'absence de transfert de FRET ne signifie pas forcément que les molécules ne sont pas à proximité et qu'elles n'interagissent pas. En effet, comme nous l'avons abordé précédemment, une mauvaise orientation des dipôles peut empêcher les transferts de FRET.

Bien que l'imagerie de FRET présente certaines limitations, ses applications sont diverses et permettent de faire des analyses quantitatives et qualitatives ainsi que de suivre différents processus

biologiques tels que le repliement d'une protéine, les interactions entre protéines [35]. De manière générale cette technique est un moyen très efficace pour sonder le micro-environnement local d'un fluorophore.

4.2 Mises en œuvre pour la détection

Le suivi de l'interaction entre deux protéines par hétéroFRET en milieu cellulaire va nécessiter la co-transfection de deux plasmides (ADN circulaire superenroulé), contenant chacun les gènes codant pour les protéines d'intérêt fusionnées aux sondes fluorescentes. Etant donné que les niveaux d'expression de chacune des protéines ne sont pas contrôlables en cellule et varient d'une cellule à l'autre, toutes les protéines « donneur » ne sont pas en interaction avec toutes les protéines « accepteur », la surexpression du donneur et/ou de l'accepteur est alors possible. Il faut donc être vigilant pour limiter la surexpression, en réduisant les quantités d'ADN transfectées et en sélectionnant les cellules avec des niveaux intermédiaires de fluorescence. L'utilisation de lignées stables, qui expriment la protéine d'intérêt de la même façon que les protéines endogènes est l'idéal.

Par conséquent, plusieurs populations de molécules seront présentes : le donneur seul, le donneur en interaction et l'accepteur seul. Pour effectuer des mesures de FRET, il faut donc en théorie faire des mesures de contrôle sur plusieurs échantillons :

- échantillon avec le donneur seul.
- échantillon avec l'accepteur seul.
- échantillon de FRET où le donneur et l'accepteur sont présents.
- échantillon contrôle négatif : donneur et accepteur présents avec une colocalisation parfaite mais il n'y a pas d'interaction.
- échantillon contrôle positif qui présente un FRET constitutif.

4.2.1 Imagerie de FRET en intensité de fluorescence (méthode ratiométrique)

L'imagerie de FRET en intensité s'appuie sur l'augmentation de l'intensité de fluorescence de l'accepteur dans le cas où un transfert d'énergie de type FRET se produit. L'analyse des spectres d'émission permet ainsi de déterminer si un transfert a bien lieu.

En effectuant des mesures sur les échantillons où sont respectivement exprimés le donneur seul puis l'accepteur seul, l'observation du spectre d'émission de l'échantillon où les deux espèces (donneur et accepteur) sont présentes permettra d'évaluer si un transfert de FRET s'effectue (Fig.1.14.A&B). En effet, s'il y a un transfert de FRET, en excitant le donneur, on va constater une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur aux dépends de celle du donneur (Fig.1.14.B). Cela va donc engendrer une modification significative du spectre de fluorescence par rapport au cas où aucun transfert n'a lieu (Fig.1.14.A). Dans la pratique pour ce type de mesure on utilise un cube FRET comportant le filtre adapté au spectre d'excitation du donneur, le filtre associé à l'émission de l'accepteur et un miroir dichroïque qui réfléchit l'excitation correspondant au donneur et transmet l'émission correspondant à l'accepteur.

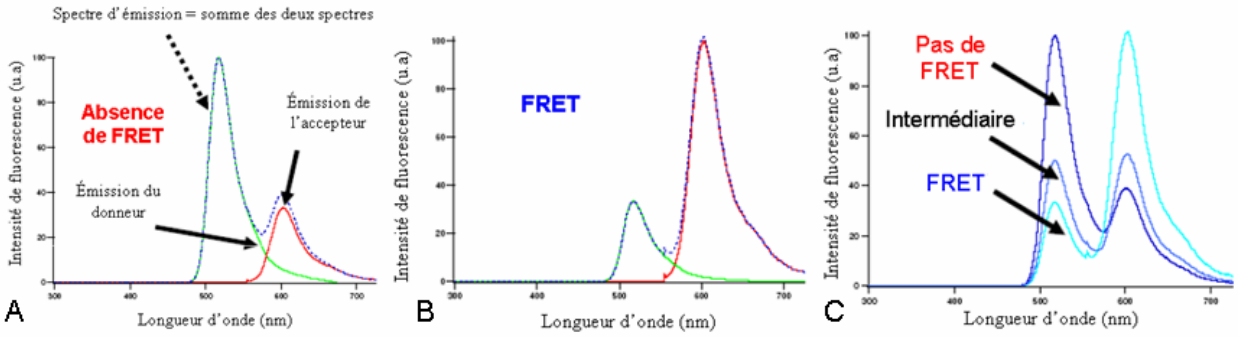


Fig.1.14: Mesure de FRET par intensité. Mise en évidence d'une absence de FRET (A), de la présence de FRET (B) et de différents niveaux de transfert [65].

Entre les deux cas extrêmes où aucun transfert n'a lieu (on retrouve le spectre d'émission du donneur et une petite contribution de l'accepteur, Fig.1.14.A) et le cas où un transfert a lieu avec une très bonne efficacité (on retrouve le spectre d'émission de l'accepteur et une faible contribution provenant du donneur, Fig.1.14.B), il y a tous les cas intermédiaires pour lesquels l'efficacité de transfert est moins importante (Fig.1.14.C). Les mesures de FRET en intensité reposent essentiellement sur une analyse spectrale. Or, dans ces mesures de FRET par intensité, il ne faut pas négliger les fuites spectrales qui proviennent à la fois de l'excitation directe de l'accepteur dans le cube FRET et de la fuite spectrale du donneur dans le cube FRET à la détection (Fig.1.15). Il faut donc corriger les mesures de FRET par intensité en prenant en compte ces fuites spectrales qui dépendent notamment de la concentration des espèces donneur et accepteur.

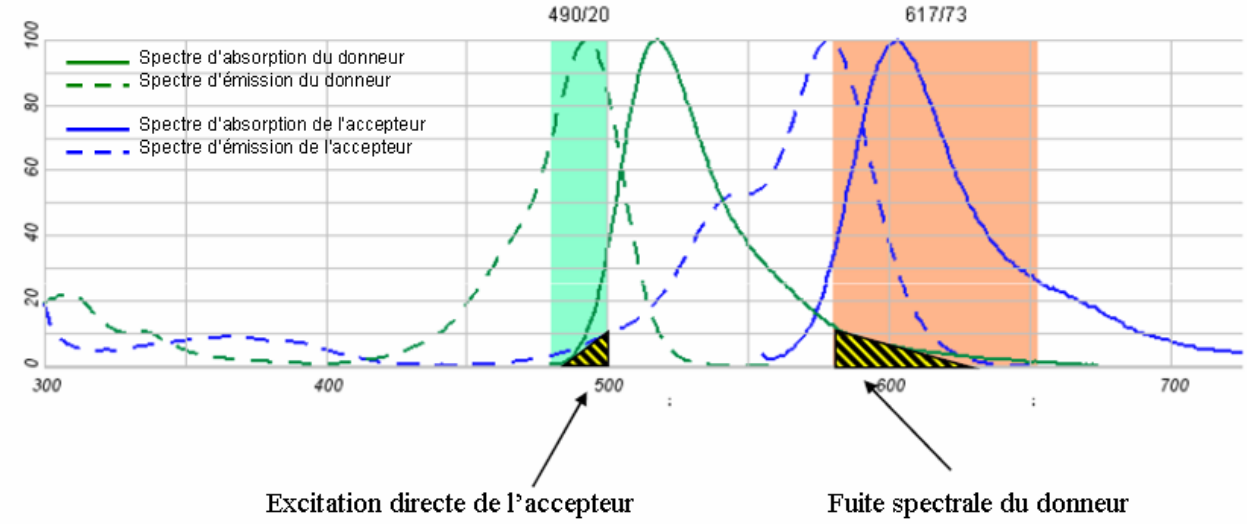


Fig. 1.15: Mise en évidence des fuites spectrales liées à l'excitation directe de l'accepteur ou à la détection de l'émission de la fluorescence du donneur dans la mesure de FRET en intensité [65].

Les mesures de FRET en intensité présentent donc des avantages liés à la simplicité de la mise en œuvre, toutes les mesures peuvent être effectuées avec un microscope confocal ou à épifluorescence. Cette technique est assez rapide et permet de faire des études dynamiques. Si elle apparaît comme une bonne méthode d'approche pour du FRET intramoléculaire (par exemple dans le suivi du repliement de protéines), elle doit être utilisée avec précaution dans le cas du FRET intermoléculaire (dans le suivi de l'interaction entre deux protéines différentes).

4.2.2 Imagerie de FRET par photoblanchiment de l'accepteur

Les mesures de FRET par photoblanchiment de l'accepteur se font en trois étapes. Tout d'abord, sur un échantillon exprimant à la fois le donneur et l'accepteur, on excite le donneur et on détecte la fluorescence provenant du donneur puis celle provenant de l'accepteur. On photoblanchit ensuite l'accepteur et on acquiert une image de la fluorescence du donneur et une de l'accepteur. Après photoblanchiment, on doit observer une augmentation de la fluorescence du donneur en cas de FRET.

Cette technique est simple à mettre en œuvre, elle peut s'implémenter sur un microscope en épifluorescence ou sur un confocal. De plus, elle permet de faire une mesure rapide de transfert d'énergie. Cependant cette technique présente des inconvénients. Elle se limite à l'observation d'échantillons fixés. De plus, l'autofluorescence et la photoconversion avec certains fluorophores (ex : CFP/YFP) peuvent notamment induire des erreurs de mesure. Des algorithmes ont récemment été développés pour résoudre les problèmes de fuites spectrales afin de pouvoir effectuer des mesures quantitatives d'efficacité de FRET [66].

4.2.3 Mesure du FRET par mesure de durée de vie de fluorescence

Comme nous l'avons vu précédemment, la durée de vie de fluorescence est le temps moyen durant lequel une molécule reste à l'état excité. Il y a plusieurs voies de désexcitation pour un fluorophore, le transfert d'énergie en fait partie. Ainsi pour un donneur seul, sa durée de vie sera régie par :

$$\tau_{donneur} = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \tag{1.18}$$

Dans le cas où le donneur et l'accepteur sont présents, on aura :

$$\tau_{donneur/accepteur} = \frac{1}{k_r + k_{nr}' + k_{FRET}} \tag{1.19}$$

$$\text{avec } k_{nr} = k_{nr}' + k_{FRET} \tag{1.20}$$

La présence d'un transfert d'énergie de type FRET entre le donneur et l'accepteur va donc induire une diminution de la durée de vie de fluorescence du donneur. Si on considère le couple FRET GFP/mCherry, comme la GFP possède un déclin mono-exponentiel, dans le cas où l'on retrouve ce déclin mono-exponentiel lorsque le donneur est en présence de l'accepteur, cela signifie que toutes les molécules du donneur sont libres et qu'il n'y a donc pas de FRET. De manière générale, on va obtenir des déclins bi-exponentiels avec des durées de vie de fluorescence associées au donneur seul (durée de vie longue) et au donneur en présence de l'accepteur (durée de vie courte) et les proportions associées à chaque population. Dans ce cas-là, l'efficacité de transfert s'écrit :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \tag{1.21}$$

où τ_{DA} et τ_D représentent respectivement les durées de vie du donneur en présence et en absence de l'accepteur.

Un autre paramètre a été introduit récemment dans le but de quantifier les transferts de FRET. Il s'agit de la fraction minimale de donneur en interaction mf_D [58], qui présente davantage d'intérêt en biologie par rapport à l'efficacité de transfert de FRET. Cette méthode d'analyse peut être couplée à la méthode d'acquisition de FLIM sans ajustement. Brièvement, si l'on considère un fluorophore donneur avec un déclin mono-exponentiel et deux populations, une fraction f_D qui subit une interaction de durée de vie τ_F et une autre qui ne subit pas cette interaction, de durée de vie τ_D, le déclin de l'intensité de fluorescence est alors donné par l'équation :

$$i(t) = f_D \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right) + (1 - f_D) \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) \tag{1.22}$$

D'après la relation précédente et l'équation (1.13), on en déduit les variations de f_D en fonction de τ_F / τ_D et $\langle\tau\rangle / \tau_D$. A chaque valeur τ_F / τ_D, est associée une parabole qui présente une valeur minimale. La fonction mf_D va permettre de décrire chacun de ces minima et rendra compte de la fraction minimale de donneur en interaction. Elle est donnée par la relation suivante [58] :

$$mf_D = \left[1 - \left(\langle\tau\rangle / \tau_D\right)\right] / \left[\left(\langle\tau\rangle / 2 \times \tau_D\right) - 1\right]^2 \tag{1.23}$$

Ce paramètre est particulièrement intéressant en biologie car il permet d'extraire une fraction minimale de donneur en interaction sans connaître préalablement τ_F et sans ajustement exponentiel.

La mesure de FLIM peut également être associée à la mesure en intensité de photoblanchiment de l'accepteur. En effet, dans le cas où il y a bien un transfert de FRET, le déclin de fluorescence du donneur en présence de l'accepteur sera bien mono-exponentiel alors qu'avant photoblanchiment il devait être bi-exponentiel en raison des deux populations (donneur en interaction et donneur seul). L'efficacité de transfert est alors donnée par la relation :

$$E = 1 - \frac{\tau_{blD}}{\tau_{blA}} \tag{1.24}$$

où τ_{blD} et τ_{blD} sont les durées de vie de photoblanchiment du donneur en présence et en absence de l'accepteur, qui suivent une décroissance exponentielle. Cette technique est applicable pour des mesures en cellules [67].

Les mesures d'efficacité de FRET seront plus facilement accessibles avec une plus grande robustesse avec la mesure de durée de vie de fluorescence (FLIM). Cette efficacité pourra être reliée à la distance séparant les deux fluorophores et au phénomène biophysique sous-jacent. Ce système est néanmoins coûteux et peut nécessiter des techniques d'acquisition et d'analyse complexes.

5 Autres techniques pour suivre des interactions moléculaires

5.1 BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*

Le BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) est une technique dérivée du FRET. Le transfert non radiatif d'énergie a lieu entre une protéine bioluminescente (le donneur de BRET) et un fluorophore (accepteur de BRET) s'ils sont à proximité (< 10 nm). Par ce processus de bioluminescence, l'énergie chimique va être convertie en énergie lumineuse. Ce phénomène a d'abord été mis en évidence dans des organismes vivants tels que les méduses ou les lucioles. La luminescence provient de l'oxydation d'un substrat par son enzyme. Le donneur de BRET est cette enzyme lumineuse et la plus communément utilisée est la *Renilla luciferase*, qui catalyse l'oxydation de son substrat (la coelenterazine) avec un maximum d'émission à 480 nm. Le BRET est compatible avec l'imagerie en cellules vivantes car la coelenterazine est hydrophobe et peut pénétrer dans les cellules. D'autres protéines bioluminescentes existent avec différentes longueurs d'onde d'émission [68].

Alors que les transferts d'énergie de type FRET nécessitent une excitation externe, le BRET va avoir lieu directement après l'oxydation du substrat. Cette technique permet de pallier certaines limitations du FRET telles que les problèmes d'autofluorescence, le photoblanchiment, l'excitation simultanée du donneur et de l'accepteur. En revanche, des protéines fusion entre la protéine d'intérêt et le donneur de BRET doivent être réalisées, ce qui fait que cette méthode n'est pas adaptée pour le marquage de protéines endogènes. Concernant les accepteurs de BRET, les protéines fluorescentes sont les plus souvent utilisées car elles peuvent facilement marquer les protéines d'intérêt par encodage génétique. Les QDs ont également été utilisés pour faire du BRET *in vivo* [69]. Le BRET est ainsi une technique alternative pour suivre des interactions entre protéines [70], [71].

5.2 BiFC : *Bimolecular Fluorescence Complementation*

La technique de BiFC permet une visualisation directe de l'interaction entre deux protéines. Elle repose sur le principe que deux fragments non fluorescents d'un même fluorophore vont pouvoir s'associer et se compléter pour former un complexe fluorescent, lorsque chacun de ces fragments est fusionné avec des protéines susceptibles d'interagir [72]. L'association covalente de ces deux fragments produira un complexe complet fluorescent (Fig.1.16). L'émission de fluorescence signifiera alors que les deux protéines interagissent.

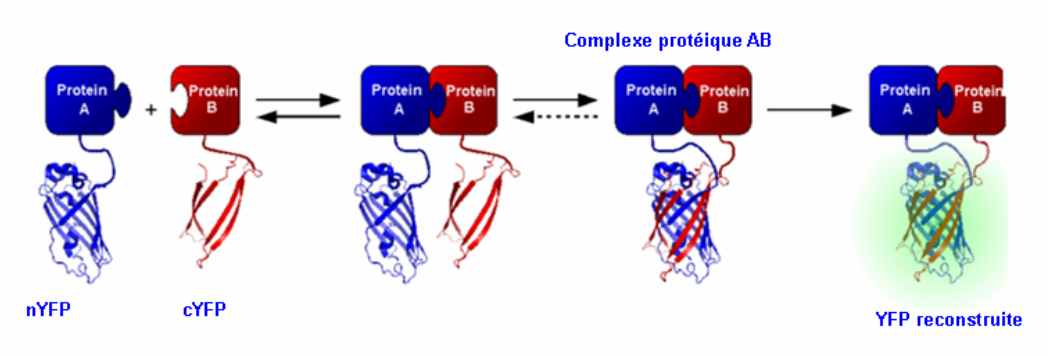


Fig.1.16: Principe du BiFC [http://de.wikipedia.org/].

La mesure des interactions par BiFC est plus sensible que les mesures par imagerie de FRET car :

- aucune distance minimale n'est requise entre les deux protéines.
- il n'y a aucune restriction d'orientation entre les protéines.
- un faible niveau d'expression est possible.
- les interactions transitoires sont impossibles.

C'est un processus qui n'est pas réversible, l'assemblage est covalent. C'est la preuve indirecte d'une interaction comme pour l'imagerie de FRET.

Pour effectuer des mesures par la méthode BiFC, il faut tester plusieurs échantillons. Un échantillon de contrôle négatif doit être testé dans lequel les deux fluorophores sont exprimés, colocalisent parfaitement mais n'interagissent pas (ex : deux plasmides sans les protéines d'intérêt). Un échantillon avec deux protéines connues en interaction doit être observé (contrôle positif) et enfin l'échantillon avec les protéines d'intérêt.

Les mesures d'interaction par BiFC offrent une grande simplicité pour la mise en œuvre, sont rapides et permettent de faire des études dynamiques. Il y a néanmoins des artefacts liés notamment à l'autofluorescence et un risque de faux positif dans le cas de surexpression. C'est de plus un processus qui n'est pas réversible (assemblage covalent), la réponse sera donc uniquement qualitative (oui/non), ce qui peut être un facteur limitant en biologie.

5.3 La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

La FCS est une technique de spectroscopie de fluorescence permettant l'analyse à haute résolution spatiale et temporelle de molécules peu concentrées mais est efficace uniquement si les concentrations des espèces étudiées et les volumes de détection sont faibles. Cela implique donc que peu de molécules soient détectées simultanément au même moment. Les concentrations idéales se situent entre le subnanomolaire et le micromolaire (soit entre 10^{-9} et 10^{-6} M).

Le développement de systèmes très sensibles (photodiode à avalanche, photomultiplicateur…) et des techniques de microscopie de fluorescence ont permis de résoudre les problèmes initiaux de la FCS tels que la faiblesse du signal de fluorescence (peu de molécules fluorescentes) et la nécessité d'avoir un petit volume de détection [73]. Les microscopies confocale et biphotonique permettent ainsi de définir des volumes d'excitation de l'ordre du femtolitre (10^{-15} L ou 1 μm^3) (Fig.1.17.A). L'excitation biphotonique induit un meilleur confinement de l'excitation permettant ainsi une détection exclusive de la fluorescence émise avec un bruit de fond très faible pouvant permettre la détection de molécules uniques [74].

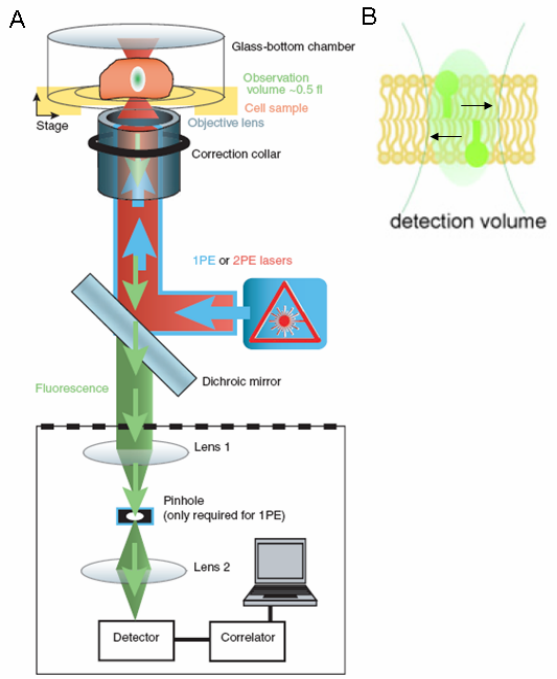


Fig.1.17: (A) Schéma d'un dispositif de FCS pour une excitation à un photon ou à deux photons [75]. *(B) Représentation schématique des fluctuations des molécules dans le volume de détection* [76].

Le principe de la FCS consiste donc à mesurer les fluctuations d'intensités de fluorescence émises dans le volume sondé au cours du temps. Expérimentalement, on va compter le nombre de photons émis dans un intervalle de temps fixé et pour un nombre d'intervalles donné (Fig.1.17.B). L'analyse de l'autocorrélation du signal de fluorescence (équation (1.25) et Fig.1.18.C) donne le temps de résidence τ des particules dans le volume d'étude. Ce temps correspond au temps de déclin de la fonction de corrélation et la concentration ou le nombre de molécules peuvent être extraites de l'amplitude de la courbe d'autocorrelation [77]. La fonction d'autocorrélation est définie par la relation suivante :

$$G(\tau) = \frac{\langle I_F(t) I_F(t+\tau) \rangle}{\langle I_F^2(t) \rangle} = \frac{\int I_F(t) I_F(t+\tau) dt}{\int I_F^2(t) dt} \tag{1.25}$$

où l'on considère que l'intensité fluctue autour d'une valeur moyenne définie par :

$$I_F(t) = \langle I_F \rangle + \delta I_F(t) \tag{1.26}$$

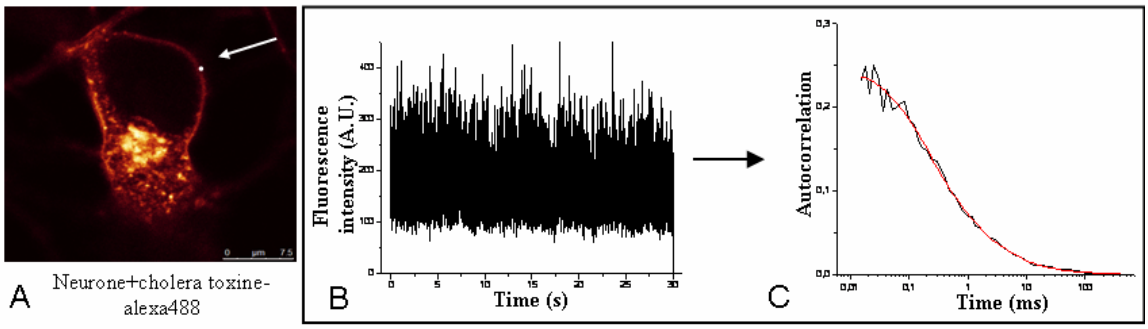


Fig.1.18: Mesures en FCS en excitation à 1 photon faites en neurones d'hippocampe d'embryons de rat mis en contact avec la toxine cholérique marquée à l'Alexa 488 (A). Les fluctuations de l'intensité du signal de fluorescence sont représentées (B) ainsi que la courbe d'autocorrélation obtenue à partir de ces fluctuations (C).

La mesure des temps de diffusion va ainsi renseigner sur les interactions entre les différentes espèces moléculaires. Un bon modèle d'étude pour le suivi de telles réactions consiste en un ligand

marqué avec un fluorophore et son récepteur non fluorescent. Ce dernier doit être de taille proportionnellement plus importante pour que la formation du complexe ligand/récepteur induise une modification significative des temps de diffusion. Avec une seule espèce marquée, on peut ainsi suivre le processus d'association entre le récepteur et son ligand jusqu'à ce qu'un équilibre chimique soit atteint ou que l'une des deux espèces ait complètement réagi [78]. En connaissant le temps de diffusion du ligand marqué seul, l'utilisation d'un ajustement avec deux temps de diffusion permet d'extraire le temps de diffusion du complexe formé. L'hybridation de sondes ADN peut ainsi être suivie par cette technique [79].

D'autre part, la mobilité des molécules est modifiée dans le cas où des interactions au niveau de la membrane ont lieu, que ce soit par ancrage direct à la membrane ou par l'interaction avec une protéine membranaire. Des mesures en cellules pour le suivi de telles interactions ont été faites sur le déplacement de EGF (*Epidermal Growth Factor*) par exemple [80] à et hors de la membrane plasmique des cellules ou dans le suivi de l'effet du cholestérol sur la distribution de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer au niveau des radeaux lipidiques [81].

Cependant, si l'on s'intéresse par exemple aux interactions entre une enzyme et son substrat, le changement en terme de masse entre l'enzyme seule et le complexe enzyme/substrat sera relativement faible. Les temps de diffusion diffèrent par moins d'un facteur 2 dans ce cas, ce qui rend les analyses quantitatives difficiles. Une solution est de faire un double marquage pour chacune des molécules d'intérêt et d'utiliser alors la spectroscopie en corrélation croisée de fluorescence (FCCS) [82].

5.4 La spectroscopie en corrélation croisée de fluorescence (FCCS)

La spectroscopie en corrélation croisée de fluorescence (FCCS *Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy*) permet de quantifier des interactions telles que des interactions protéine/protéine en cellules vivantes [83], [84]. Cette technique est dérivée de la FCS [85] et va permettre de mesurer des interactions moléculaires avec une sensibilité à la molécule près, indépendamment de la taille et de la masse des molécules d'intérêt. Cette technique a été mise en application pour suivre des interactions moléculaires [82], des interactions de type ligand/récepteur [77]. Des mesures de FCCS *in vivo* ont également été effectuées [86].

La FCCS utilise un double marquage et une détection simultanée des deux marqueurs de couleurs différentes. Expérimentalement, le montage est semblable au montage FCS classique (Fig.1.17.A) mais avec deux sources laser et deux détecteurs pour chacun des deux fluorophores. Un des points critiques de ce montage est qu'il nécessite une superposition parfaite des deux faisceaux lasers de telle sorte que les volumes focaux se superposent. Il faut donc soit utiliser un laser multi-lignes pour l'excitation ou bien avoir recours à une excitation biphotonique qui ne nécessite qu'une source laser IR [87] ou encore employer une deuxième source laser et un second détecteur. Dans ce cas-là, il s'agit du montage de corrélation croisée à deux couleurs, qui est beaucoup plus cher et plus difficile à ajuster mais cette technique permet une plus grande accordabilité. Contrairement à la FCS classique où l'analyse repose sur les courbes d'autocorrélation, le paramètre le plus important désormais est l'amplitude de la courbe de la corrélation croisée définie par la relation ci-dessous en considérant deux espèces fluorescentes verte (V) et rouge (R) :

$$G_{VR}(t) = 1 + \frac{\langle \delta I_V(t) \delta I_R(t+\tau) \rangle}{\langle I_V(t) \rangle \langle I_R(t) \rangle} = \frac{\langle I_V(t) I_R(t+\tau) \rangle}{\langle I_V(t) \rangle \langle I_R(t) \rangle} \tag{1.27}$$

où chacune des deux intensités fluctue autour d'une valeur moyenne donnée par l'équation (1.26). On s'intéresse donc à l'occurrence de fluctuations d'intensité induites par les deux espèces en présence, dans chacune des deux voies de détection. Par la détection simultanée des deux marqueurs, on peut acquérir le signal d'autocorrélation de chacune des voies et le signal de corrélation croisée des deux voies. L'amplitude du signal de corrélation croisée donne une mesure directe de la concentration des molécules doublement marquées diffusant à travers le volume focal ce qui permet de suivre les réactions de liaison. On peut ainsi suivre l'association ou la séparation de deux molécules marquées.

L'association entre des oligonucléotides de brins d'ADN complémentaires marqués respectivement dans le vert et dans le rouge a été mise en évidence par cette technique [82]. Des développements ont également été réalisés pour faire de la SW FCCS (*Single Wave* FCCS) qui n'utilise qu'une seule longueur d'onde d'excitation [88]. Il faut bien choisir les fluorophores de façon à ce qu'ils soient excitables avec la même source. Cela a été rendu possible grâce au développement de nombreuses sondes fluorescentes avec des grands déplacements de Stokes [89]. Cette technique permet d'utiliser des fluorophores plus stables, de travailler avec des longueurs d'onde plus longues et de limiter ainsi les dommages cellulaires et l'autofluorescence.

Ces mesures de FCS ou de FCCS ont été associées à d'autres techniques comme le FRET pour le suivi de l'homodimérisation et de l'hétérodimérisation de molécules [83]. La FCS a également été couplée à l'excitation en réflexion totale interne (TIRF). L'association de ces deux techniques permet de suivre de manière dynamique le mouvement de molécules localisées à la membrane des cellules [90]. Des développements ont été effectués pour ajouter une composante spatiale aux techniques de FCS traditionnelles (RICS, *Raster Scanning Image Correlation Spectroscopy*) [91].

5.5 Anisotropie de fluorescence

L'anisotropie de fluorescence permet également le suivi de l'interaction entre molécules et sera développée en détails dans le chapitre IV. Brièvement, cette technique repose sur l'analyse de la dépolarisation de la fluorescence. Elle va ainsi permettre de suivre des interactions entre protéines identiques avec un seul marquage et de mettre en évidence de l'homoFRET [92]. L'imagerie de l'anisotropie de fluorescence peut être effectuée de manière statique (*steady state anisotropy*) ou bien résolue en temps dans le domaine temporel ou fréquentiel avec des méthodes d'acquisition en plein champ ou point par point [30].

Les mesures d'anisotropie de fluorescence ont également été utilisées pour suivre de l'hétéroFRET. Cette détection recherche à mettre en évidence une dépolarisation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. En absence de FRET, l'émission de fluorescence est fortement polarisée. Dans le cas où le donneur et l'accepteur interagissent (FRET), on observe une dépolarisation de l'émission de fluorescence de l'accepteur lorsque l'on excite le donneur, ce qui induit une diminution de l'anisotropie de fluorescence de l'accepteur. En effet, dans le cas où un transfert non radiatif d'énergie a lieu entre le donneur et l'accepteur, la lumière émise par l'accepteur ne sera pas contrainte par la polarisation de la lumière excitatrice du donneur. Cette technique permet entre autres d'éliminer les faux positifs de FRET, dans les techniques d'analyse spectrale ou d'intensité, qui peuvent être liés à une excitation directe de l'accepteur de FRET (fuite spectrale à l'excitation). En effet, avec cette méthode, toute excitation directe de l'accepteur se traduira par une augmentation de son anisotropie de fluorescence. Cette technique a été notamment utilisée pour mettre en évidence la présence de FRET entre deux protéines fluorescentes (Cerulean et Venus) formant un tandem en cellules vivantes [93]. Cette méthode permet de savoir si du FRET a lieu mais elle présente certains inconvénients. En effet, la stœchiométrie des paires de FRET doit être connue et le donneur et l'accepteur doivent présenter de fortes anisotropies initiales [64]. L'anisotropie de fluorescence reste une méthode de choix pour mettre en évidence de l'homoFRET, comme nous le verrons dans le chapitre IV.

5.6 Analyse de la brillance

Pour suivre l'interaction entre des molécules, on peut également recourir à une analyse de la brillance. La brillance moléculaire est le nombre moyen de photons émis dans le volume d'observation. Cette information est donnée par l'amplitude des statistiques de comptage de photons. Ces méthodes basées sur l'analyse de la brillance s'appellent PCH (*Photon Counting Histogram*) ou FIDA (*Fluorescence Intensity Distribution Analysis*). Elles reposent sur l'hétérogénéité des distributions des intensités de fluorescence pour mesurer la brillance des différentes espèces dans l'échantillon [94]. Ainsi les dimères auront deux fois plus de marqueurs fluorescents que les monomères ; par conséquent leur brillance sera deux fois plus forte que celle des monomères.

La méthode PCH différencie les espèces en fonction de leur brillance alors qu'en FCS les courbes d'autocorrélation séparent les espèces en fonction de leur temps de diffusion. Or, comme nous l'avons vu, la FCS est parfois limitée quand il s'agit de distinguer des espèces ayant des poids moléculaires similaires. Dans ce cas-là, la méthode de PCH permettra de faire la différence entre des monomères ou la formation de dimères et sera particulièrement adaptée dans le suivi de l'homodimérisation de molécules. La brillance est donc une grandeur relative qui renseigne sur l'oligomérisation de molécules [95] et qui est applicable en cellule vivante.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse de la corrélation croisée avec la FCCS à deux couleurs, qui prend en compte simultanément les fluctuations de l'intensité de fluorescence dans les deux voies de détection, permet d'augmenter la probabilité de détection des interactions du type protéines/protéines [96]. De même que pour la FCS, de façon à accroître la sensibilité du montage, des développements ont été effectués en PCH pour séparer les espèces non seulement en fonction de leur brillance mais aussi en fonction de leur couleur. L'ajout d'un second détecteur permet ainsi de faire de la PCH à deux couleurs ou Dual Color PCH [97]. C'est une technique plus sensible pour sonder des interactions protéiques [98].

6 Projet

Mon travail répond à la nécessité de développer des outils instrumentaux originaux en microscopie de fluorescence qui soient réellement adaptés à des problématiques biologiques spécifiques. Ici, notre objectif a été de réaliser un suivi dynamique de l'interaction entre deux protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer, de la membrane plasmique jusqu'au cytoplasme des cellules. Comme nous l'avons vu précédemment, l'imagerie de FRET associée à la mesure de durée de vie de fluorescence est un outil puissant pour suivre des interactions entre protéines. De plus la microscopie TIRF s'avère être une technique de choix dans l'observation de processus membranaires. Ces différentes techniques avaient déjà été associées au cours de la thèse de Pierre Blandin et avaient abouti au développement d'un microscope de fluorescence résolue en temps et en réflexion totale interne (TIRFLIM). Ce montage original associait l'imagerie en plein champ avec une résolution axiale sub-longueur d'onde grâce à la microscopie TIRF et une mesure rapide de la durée de vie de fluorescence grâce à une source impulsionnelle accordable et un intensificateur à déclenchement périodique. Des premiers résultats encourageants en cellule avaient été obtenus. Nous avons donc conservé cette approche, mais repensé le montage afin que des expériences sur des échantillons biologiques puissent être réalisées de façon reproductible dans les conditions physiologiques des cellules. En particulier, j'ai mis en place un dispositif pour passer d'une excitation sous onde évanescente à une excitation en épifluorescence et évaluer les performances de notre dispositif en terme de résolution. Les caractéristiques du montage ainsi que les différentes techniques destinées au contrôle de l'onde évanescente, seront décrites dans le chapitre II. Nous aborderons dans ce cadre l'association de ce dispositif avec des surfaces plasmoniques (SPETIRF *Surface Plasmon Enhanced Total Internal Reflection Fluorescence*).

Notre microscope TIRFLIM nous a permis d'étudier, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Marie-Claude Potier et Charles Duyckaerts du Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (CRICM), l'effet du cholestérol sur l'hétérodimérisation entre deux protéines membranaires impliquées dans la maladie d'Alzheimer, la protéine précurseur de l'amyloïde APP (Amyloïd Precursor Protein) et une enzyme impliquée dans son clivage (la β-sécrétase BACE1). Notre dispositif TIRFLIM a donc été couplé à l'imagerie de FRET pour mettre en évidence les interactions entre ces protéines. Pour ces mesures de FRET, nous avons choisi d'utiliser le couple GFP/mCherry. J'ai dans un premier temps étudié les interactions entre ces deux protéines dans des cellules modèles HEK-293 en faisant exprimer par transfection transitoire, les deux protéines d'intérêt. Les expériences ont dans un second temps été réalisées sur des neurones d'hippocampe d'embryons de rat, cellules de la zone du cerveau directement touchée par la maladie d'Alzheimer. Le suivi dynamique de l'effet du cholestérol sur la proximité entre APP et BACE1, de la membrane plasmique

jusqu'au cytoplasme des cellules, en contrôlant les modalités de l'excitation (TIRF ou épifluorescence) sera détaillé dans le chapitre III.

Différentes études indiquent que la formation d'un dimère APP favoriserait l'action de ses enzymes de clivage. Nous nous sommes donc également intéressés au suivi de l'homodimérisation de protéines. Pour mettre en évidence cette interaction, nous avons choisi d'effectuer de l'homoFRET en utilisant l'anisotropie de fluorescence résolue en temps. J'ai donc adapté notre microscope TIRFLIM pour pouvoir évaluer la dépolarisation de la fluorescence au cours du temps et mesurer ainsi les variations de l'anisotropie de fluorescence. J'ai dans un premier temps calibré le dispositif, en utilisant la capacité des mesures d'anisotropie de fluorescence à sonder la viscosité de l'environnement de fluorophores de référence. J'ai ainsi fait apparaître différents facteurs instrumentaux induisant des dépolarisations. J'ai ensuite proposé une approche expérimentale qui corrige les mesures, de la dépolarisation induite par la forte ouverture numérique de l'objectif pour une excitation en épifluorescence. Dans un second temps, les premières mesures mettant en évidence un transfert d'homoFRET ont été effectuées en cellules sous excitation en épifluorescence puis sous excitation TIRF. L'ensemble de ces résultats fait l'objet du chapitre IV.

Chapitre II : Microscope TIRFLIM

Ce chapitre est consacré à la description de notre microscope TIRFLIM et aux différents développements qui ont été effectués pour améliorer ses performances. Nous allons dans un premier temps voir le principe de la réflexion totale interne puis détailler la technique de mesure de durée de vie de fluorescence que nous avons choisie.

1 Principe de la microscopie TIRF

1.1 Principe physique de la réflexion totale interne

La microscopie TIRF repose sur la physique de la réflexion totale et du champ évanescent. Considérons une interface entre deux milieux d'indices respectifs n_1 pour le milieu incident et n_2 pour le second milieu. D'une manière générale, un rayon incident à cette interface suit la loi de la réfraction de Snell-Descartes donnée par:

$$n_1 \sin(i_1) = n_2 \sin(i_2) \tag{2.1}$$

Un phénomène de réflexion totale interne pourra avoir lieu lorsque $n_1 > n_2$. Dans ces conditions, le rayon réfracté s'écarte de la normale (à l'interface) (Fig.2.1). Au fur et à mesure que l'angle d'incidence i_1 augmente, le rayon réfracté se rapproche de l'interface, et de plus en plus d'énergie est transférée au rayon réfléchi. A partir d'une certaine valeur de i_1 toute l'énergie est réfléchie dans le milieu initial et on se trouve alors en réflexion totale interne. Ceci se produit pour des valeurs d'angle d'incidence supérieures à l'angle critique i_c défini par :

$$n_1 \sin(i_c) = n_2 \sin\left(\frac{\pi}{2}\right) \tag{2.2}$$

$$\sin(i_c) = \frac{n_2}{n_1} \tag{2.3}$$

Dans cette configuration de réflexion totale, on génère une onde évanescente, qui va se propager parallèlement à la surface. Ce principe a donné naissance au dispositif de microscopie de fluorescence appelé TIRFM, où l'excitation de l'échantillon est réalisée grâce au champ évanescent, engendré par le phénomène de réflexion totale interne entre la lamelle et l'échantillon [99-101].

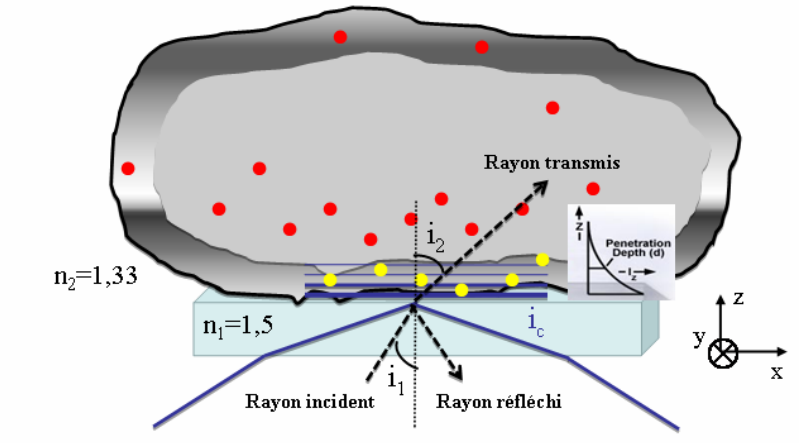


Fig.2.1 : Schéma de principe de l'excitation sous onde évanescente TIRF.

Plaçons nous dans le repère $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ orthonormal direct : $(\vec{x}, \vec{z})$ définit le plan d'incidence et $(\vec{x}, \vec{y})$ définit le plan de l'interface (Fig.2.1). Considérons une onde plane propagative dans le milieu homogène d'indice n_1, avec un angle d'incidence i_1 par rapport à la normale à l'interface avec le milieu d'indice n_2.

D'après la loi de Snell-Descartes (2.1), le cosinus de l'angle formé par le rayon transmis avec la normale est donné par :

$$\cos^2(i_2) = 1 - \sin^2(i_2) \tag{2.4}$$

$$\cos^2(i_2) = 1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) \tag{2.5}$$

Si nous nous plaçons en configuration de réflexion totale, on a :

$$0 < i_c < i_1 < \frac{\pi}{2} \tag{2.6}$$

Ce qui se traduit par :

$$0 < \sin(i_c) = \frac{n_2}{n_1} < \sin(i_1) \tag{2.7}$$

d'où,

$$1 < \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) \tag{2.8}$$

Par conséquent, d'après (2.5), le cosinus de l'angle transmis est imaginaire pur et vaut :

$$\cos(i_2) = \pm i \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) - 1} \tag{2.9}$$

D'après les conditions de continuité imposées par les équations de Maxwell, une partie du champ va être transmise au second milieu et rester confinée à proximité de l'interface [102]. Avec une onde incidente plane d'amplitude A, la solution des équations de Maxwell pour le champ électrique transmis dans le milieu d'indice n_2 peut être écrite sous la forme :

$$\overrightarrow{E_2} = A\overrightarrow{E_{20}} \exp\left[i\left(\overrightarrow{k_2} \cdot \vec{x} - \omega t\right)\right] \tag{2.10}$$

avec $\overrightarrow{k_2}$ le vecteur d'onde dans le milieu d'indice n_2, de norme $k_2 = \frac{2\pi n_2}{\lambda_0}$ où λ_0 est la longueur d'onde dans le vide. Nous obtenons, en introduisant l'angle de réfraction i_2 :

$$\overrightarrow{E_2} = A\overrightarrow{E_{20}} \exp[i(k_{2x}x + k_{2z}z - \omega t)] \tag{2.11}$$

$$\overrightarrow{E_2} = A\overrightarrow{E_{20}} \exp[i(k_2 \sin(i_2)x + k_2 \cos(i_2)z - \omega t)] \tag{2.12}$$

Puis, en utilisant les relations (2.1) et (2.9) :

$$\overrightarrow{E_2} = A\overrightarrow{E_{20}} \exp\left[i\left(k_2 \frac{n_1}{n_2}\sin(i_1)\times x - \omega t\right)\right] \times \exp\left(\pm k_2 \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) - 1} \times z\right) \tag{2.13}$$

Seule la solution avec un argument de l'exponentielle réel négatif convient physiquement (sinon l'amplitude tend vers l'infini quand z tend vers l'infini), donc :

$$\overrightarrow{E_2} = A\overrightarrow{E_{20}} \exp\left[i\left(k_2 \frac{n_1}{n_2}\sin(i_1)\times x - \omega t\right)\right] \times \exp\left(-k_2 \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) - 1} \times z\right) \tag{2.14}$$

L'onde résultante se propage donc suivant x, c'est-à-dire parallèlement à la surface et décroît exponentiellement suivant z. Une telle onde est par conséquent évanescente et son intensité est donnée par :

$$I_2(z) = I_0 \times \exp\left(-2k_2 \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) - 1} \times z\right) \tag{2.15}$$

$$I_2(z) = I_0 \times \exp\left(-\frac{z}{d}\right) \tag{2.16}$$

$$\text{avec } d = \frac{1}{2k_2 \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) - 1}} = \frac{\lambda_0}{2 \times 2\pi n_2 \times \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2(i_1) - 1}}$$

$$\text{soit } d = \frac{\lambda_0}{4\pi \times \sqrt{n_1^2 \sin^2(i_1) - n_2^2}} \tag{2.17}$$

Cette longueur, caractéristique de la décroissance de l'intensité, est appelée profondeur de pénétration du champ évanescent [100], [103]. Cette grandeur est indépendante de la polarisation de l'onde évanescente.

Les propriétés de polarisation de l'onde évanescente peuvent être mises en évidence par le calcul des composantes du champ électrique évanescent. Si l'on se place dans le repère $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ (avec $i_1 > i_c$ pour que ce champ évanescent existe) ces composantes peuvent être calculées en utilisant les équations de Fresnel, qui fournissent le rapport entre les champs électriques transmis et incident. En considérant que le faisceau incident est polarisé avec un angle α par rapport au plan d'incidence, on obtient les composantes suivantes pour le champ électrique évanescent $\overrightarrow{E_{20}}$:

$$E_{20x} = \frac{2\cos(i_1) n_1 \times \sqrt{n_1^2 \sin^2(i_1) - n_2^2}}{\sqrt{n_2^4 \cos^2(i_1) + n_1^4 \sin^2(i_1) - n_1^2 n_2^2}} \times \cos(\alpha) \times \exp\left[-i\left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_1^4 \sin^2(i_1) - n_1^2 n_2^2}}{n_2^2 \cos(i_1)}\right) + \frac{\pi}{2}\right)\right] \tag{2.18}$$

$$E_{20y} = \frac{2\cos(i_1)n_1}{\sqrt{n_1^2 - n_2^2}} \times \sin(\alpha) \times \exp\left[-i\left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_1^2 \sin^2(i_1) - n_2^2}}{n_1 \cos(i_1)}\right)\right)\right] \tag{2.19}$$

$$E_{20z} = \frac{2n_1^2 \cos(i_1)\sin(i_1)}{\sqrt{n_2^4 \cos^2(i_1) + n_1^4 \sin^2(i_1) - n_1^2 n_2^2}} \times \cos(\alpha) \times \exp\left[-i\left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_1^4 \sin^2(i_1) - n_1^2 n_2^2}}{n_2^2 \cos(i_1)}\right)\right)\right] \tag{2.20}$$

[104], [105].

D'après les relations précédentes, on en déduit que lorsque le champ électrique incident est perpendiculaire au plan d'incidence ($\alpha = \pi/2$), les deux composantes E_{2x} et E_{2z} du champ évanescent sont nulles. Le champ électrique évanescent est alors transverse à la direction de propagation (soit perpendiculaire au plan d'incidence).

Lorsque le champ électrique incident est dans le plan d'incidence ($\alpha = 0$), le champ électrique évanescent a des composantes non nulles suivant les directions parallèle et perpendiculaire à la direction de propagation (*x* et *z*). Le champ électrique évanescent reste dans ce cas dans le plan d'incidence et la polarisation de l'onde évanescente est alors elliptique. Avec une telle polarisation incidente, il est possible d'avoir une onde évanescente polarisée perpendiculairement à l'interface pour un angle d'incidence égale à l'angle critique.

Pour ces deux polarisations particulières, l'intensité relative du champ évanescent par rapport à celle du champ incident est facilement accessible à partir des composantes du champ électrique évanescent $\overrightarrow{E_{20}}$. Dans le premier cas, avec un champ électrique incident perpendiculaire au plan d'incidence, l'intensité relative est donnée par :

$$I_{r,\perp} = \left|E_{20y}\left(\alpha = \frac{\pi}{2}\right)\right|^2 = \frac{4n_1^2 \cos^2(i_1)}{n_1^2 - n_2^2} \tag{2.21}$$

Dans le second cas, avec un champ électrique incident parallèle au plan d'incidence, on obtient :

$$I_{r,//} = \left|E_{20x}(\alpha = 0)\right|^2 + \left|E_{20z}(\alpha = 0)\right|^2 = \frac{4\cos^2(i_1)\left(2n_1^4 \sin^2(i_1) - n_2^2 n_1^2\right)}{n_2^4 \cos^2(i_1) + n_1^4 \sin^2(i_1) - n_1^2 n_2^2} \tag{2.22}$$

A l'angle critique d'après les variations des grandeurs précédentes en fonction de l'angle d'incidence, on observera une augmentation d'un facteur 4 à 5 par rapport à l'intensité incidente [106]. Cette augmentation est liée aux interférences entre les faisceaux incidents et réfléchis.

Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre la présence d'une couche métallique entre les deux milieux va modifier les propriétés du champ évanescent et peut permettre de générer des plasmons de surface [23]. Dans certaines conditions, ceux-ci peuvent induire une exaltation de l'intensité de l'onde évanescente générée.

1.2 Application en microscopie de fluorescence

Le développement de la microscopie TIRF, également appelée microscopie à onde évanescente (*evanescent wave microscopy*) car reposant sur l'exploitation des propriétés des ondes évanescentes, a été motivé par la recherche constante de l'amélioration de la résolution spatiale en microscopie. Cette technique permet de réaliser une imagerie en plein champ grâce à une excitation uniforme sur une large zone. Elle permet également de diminuer de manière conséquente le temps d'acquisition car aucun dispositif de balayage de l'échantillon n'est utilisé, que ce soit à l'excitation ou à la détection (contrairement à la microscopie confocale).

Dans le cas de la microscopie de fluorescence, les échantillons biologiques observés ont un indice de réfraction voisin de 1,38 (cet indice est fonction de la teneur en eau de l'échantillon et varie typiquement de 1,35 à 1,45 [107]), et sont posés sur une lamelle de verre d'indice 1,50. Ainsi, à l'interface entre le verre et l'échantillon, la condition sur les indices est vérifiée pour permettre le phénomène de réflexion totale interne. Si l'angle d'incidence du faisceau est suffisant, la génération d'un champ excitateur évanescent est possible. Dès lors, la localisation de l'intensité lumineuse près de l'interface permet un confinement spatial de l'excitation, et confère à un tel dispositif d'imagerie une résolution axiale égale à la profondeur de pénétration du champ évanescent (2.17). Tout l'intérêt de cette technique est que la résolution axiale sub-longueur d'onde est obtenue uniquement à l'excitation et en champ large.

Les mesures effectuées avec cette technique bénéficient d'un très faible bruit de fond, puisque les fluorophores situés plus profondément dans l'échantillon ne sont pas excités. De plus cette excitation assure une exposition minimale à la lumière, des plans de l'échantillon loin de l'interface, ce qui réduit les phénomènes de photodommage et photoblanchiment. Cependant, le confinement du champ évanescent n'est pas toujours optimal et son déclin n'est pas forcément purement exponentiel, en raison des changements d'indices dans l'échantillon qui peuvent provoquer la diffusion du champ évanescent aux interfaces [100]. La fluorescence observée est alors la superposition de la fluorescence générée par l'onde évanescente et de celle générée par la lumière diffusée. Cette technique ne permet d'observer que les 100 à 200 premiers nanomètres de l'échantillon près de l'interface et exclut donc toute imagerie en profondeur. La résolution axiale sub-longueur d'onde et le très bon rapport signal sur bruit rendent ce dispositif très attractif pour l'observation en temps réel de phénomènes membranaires.

Deux configurations différentes vont permettre de faire de la microcopie TIRF. La première utilise un prisme et la deuxième, celle que nous avons choisie d'utiliser, emploie un objectif à grande ouverture numérique. Nous allons détailler succintement ces deux configurations avec leurs avantages et inconvénients respectifs.

1.3 Configurations utilisées

1.3.1 Configuration TIRF avec prisme

L'utilisation d'un prisme pour atteindre la réflexion totale interne est la première configuration qui a été utilisée historiquement, il y a une trentaine d'années [106]. Cette configuration va permettre de passer en réflexion totale pour une large plage d'angles d'incidence (Fig.2.2).

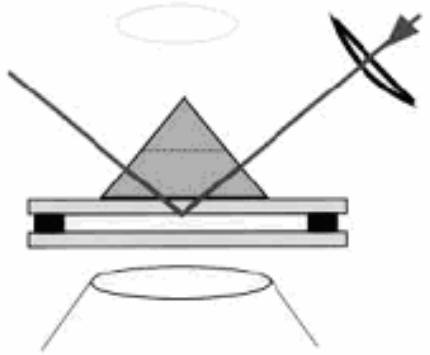


Fig.2.2: Configuration utilisant un prisme équilatéral pour réaliser la réflexion totale interne [23].

Avec cette géométrie, on peut séparer spatialement le signal d'excitation et la fluorescence ce qui améliore le rapport signal sur bruit. Cependant, elle présente certains inconvénients dont l'impossibilité d'accéder directement à l'échantillon, celui-ci étant monté entre deux lamelles et coincé

entre le prisme d'un côté et l'objectif de l'autre. Généralement, on utilise des objectifs à immersion à huile car ils permettent une collection de la fluorescence plus efficace, même si le contraste est altéré pour des échantillons épais. Afin de pouvoir se placer en réflexion totale, il faut faire attention au choix du prisme, des lamelles qui doivent avoir le même indice (pour éviter la diffusion) et au couplage optique qui doit être de bonne qualité, (d'où le recours à l'huile des deux côtés de l'échantillon). Néanmoins, l'impossibilité d'accéder à l'échantillon est un gros inconvénient même si par ailleurs ce dispositif permet d'ajuster facilement l'angle d'incidence et d'obtenir des champs évanescents très homogènes. Ainsi, le contrôle de la profondeur de pénétration est très précis dans ces conditions.

1.3.2 Configuration « à travers l'objectif »

La deuxième configuration utilise des objectifs à grande ouverture numérique. La commercialisation de ces objectifs depuis une dizaine d'années a permis le développement de la microcopie TIRF, en simplifiant son implémentation. Dans cette configuration, l'excitation et la détection se font à travers le même objectif. Seuls les objectifs avec des ouvertures numériques assez grandes (ON > n_{milieu}) vont permettre d'atteindre des angles d'excitation suffisamment élevés et d'exciter le champ évanescent. Pour un échantillon biologique ayant un indice voisin de 1,38, on utilise des objectifs dont l'ouverture numérique est supérieure à 1,4.

Avec cette configuration, le passage de l'épifluorescence au TIRF se fait très simplement en augmentant l'angle d'incidence du faisceau sur l'échantillon. Concrètement, cela va correspondre à augmenter la position hors axe du point de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif (Fig.2.3). Quand le point de focalisation est situé à la distance qui correspondrait à une ouverture numérique égale à l'indice de réfraction du milieu d'observation, on passe en réflexion totale interne et le champ évanescent est excité. On modifie ainsi de façon continue l'angle d'incidence sur l'échantillon en passant d'un angle d'incidence sub-critique en épifluorescence à un angle supercritique en TIRF (Fig.2.3).

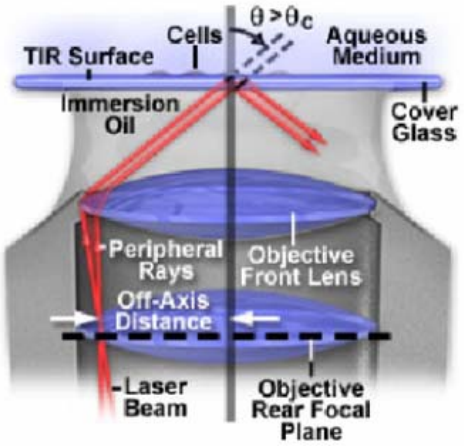


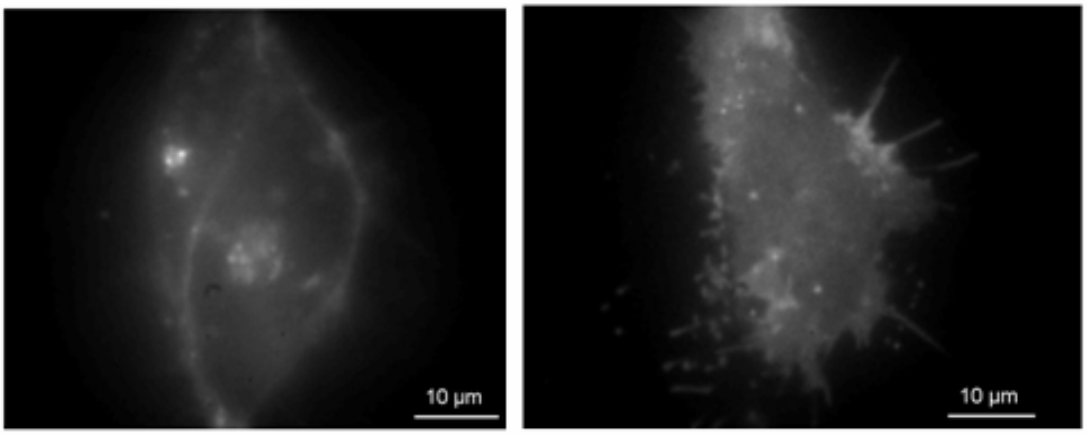
Fig.2.3 : Excitation en TIRF en utilisant un objectif à grande ouverture numérique [http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/tirf/tirfintro.html].

Le déplacement du point de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif peut se faire en translatant latéralement la lentille de focalisation ou en augmentant l'angle d'incidence sur cette lentille. Plus la focalisation dans le plan focal arrière de la lentille est de bonne qualité (plus la tache de focalisation est petite), plus le nombre d'angles émergents de l'objectif sera faible, et plus la profondeur de pénétration du champ évanescent sera homogène. Dans le cas idéal, pour une tache ponctuelle dans le plan focal arrière, on a un unique angle émergent et donc une unique profondeur de pénétration du champ évanescent. Cependant avec cette géométrie le champ évanescent va présenter des inhomogénéités notamment dues aux réflexions parasites sur les différentes optiques et à leurs

interférences. De plus, ce champ se propage dans une seule direction étant donné que l'excitation n'est pas symétrique. Des développements récents tels que le balayage du faisceau dans le plan focal arrière de l'objectif ont permis de corriger certaines inhomogénéités du champ évanescent sous excitation TIRF [108].

Cette configuration utilisant un objectif à grande ouverture numérique présente de nombreux avantages car elle s'implémente très facilement sur un microscope inversé et possède une meilleure efficacité de collection. De plus, le signal de fluorescence ne traverse pas l'échantillon, ce qui permet de limiter son absorption ainsi que les aberrations et la diffusion. Cependant, le rapport signal sur bruit est moins bon à cause des inhomogénéités de fond liées notamment à la lumière réfléchie.

La configuration utilisant un objectif à grande ouverture numérique a été choisie pour la mise en place du montage TIRF car elle permet d'avoir accès aux échantillons, ce qui est indispensable étant donné les applications auxquelles ce dispositif est dédié. On peut ainsi observer les cellules directement dans des puits de culture et suivre leur comportement en temps réel, avant et après l'ajout de réactifs divers. Nous avons utilisé deux objectifs à grande ouverture numérique : un objectif TIRF *Olympus* 60x (ON = 1,45) et un objectif *Nikon* 60x (ON = 1,49). La figure ci-dessous montre des exemples d'images en intensité d'une cellule HEK-293-C9 exprimant de manière stable les récepteurs cannabinoïdes CB1R marqués à la GFP, observée sous les deux conditions d'illumination en épifluorescence et en excitation TIRF avec un objectif à grande ouverture numérique (ON = 1,45).



EPIFLUORESCENCE TIRF

Fig.2.4: Mesures en intensité effectuées sur une cellule HEK-293-C9 exprimant CB1R-GFP sous une excitation en épifluorescence et en TIRF. La dynamique est ajustée en fonction de l'intensité du signal de fluorescence.

On constate que pour une excitation en épifluorescence, le signal de fluorescence provient essentiellement du cytoplasme alors que sous illumination TIRF, on observe uniquement la membrane de la cellule (Fig.2.4). De plus, la diffusion est réduite dans le cas d'une excitation en TIRF. Les deux types d'illumination offrent des aspects morphologiques très différents des cellules.

2 Présentation du microscope TIRFLIM

Nous avons choisi d'utiliser la microscopie TIRFLIM pour pouvoir effectuer un suivi dynamique de phénomènes biologiques. Afin de perturber au minimum les échantillons vivants observés, nous avons réalisé une détection FLIM en champ large car plus rapide. De plus, pour ne pas être limité dans le choix des fluorophores observables, nous avons décidé d'effectuer les mesures de durée de vie de fluorescence dans le domaine temporel, en utilisant une source impulsionnelle et accordable en longueur d'onde. Nous allons détailler les différents choix technologiques qui ont été faits pour notre dispositif TIRFLIM.

2.1 Mesure FLIM en plein champ

La microscopie TIRF offrant une imagerie en plein champ, le couplage avec la technique FLIM doit idéalement également permettre une détection en champ large. Pour cela, nous avons utilisé un intensificateur couplé optiquement à une caméra CCD et avons choisi d'effectuer la mesure de durée de vie de fluorescence dans le domaine temporel. On excite ainsi l'échantillon avec une impulsion ultracourte et on échantillonne le déclin de l'intensité de fluorescence en utilisant un intensificateur à déclenchement périodique (HRI, *High Rate Imager*). Celui-ci est synchronisé sur le train d'impulsions du laser grâce à une ligne à retard (contrôlée avec un pas de 25 ps par l'expérimentateur), qui va permettre d'ouvrir des « portes temporelles » à différents instants après l'impulsion excitatrice. La résolution spatiale minimale donnée par le constructeur est de 10 paires de lignes par mm pour les portes temporelles les plus courtes.

Pour les mesures de temps de vie, le HRI est utilisé dans un mode particulier appelé mode *Comb* par le constructeur (*Comb Low* pour une cadence de 20 MHz). Dans ce mode, le HRI génère une série d'impulsions ou portes via un générateur d'impulsions, synchronisé sur le train d'impulsions du laser. La largeur des portes est choisie par l'utilisateur, varie de 200 ps à 1000 ps, par pas de 100 ps et est garantie pour une fréquence du signal de synchronisation proche des valeurs définies par le constructeur (20 MHz). D'autres modes existent tels que le mode *User2* qui permet de générer des portes plus grandes (4,5 ns). Le gain de la galette de microcanaux est ajustable par l'utilisateur suivant l'intensité lumineuse incidente sur la photocathode (de 260 V à 850 V). Globalement, le HRI dicte les caractéristiques de sensibilité et de résolution du montage.

Une caméra CCD du modèle *ORCA* de *Hamamatsu* est utilisée pour lire l'écran à phosphore du HRI. La réponse spectrale de cette caméra est optimale entre 450 et 600 nm avec une efficacité quantique de l'ordre de 70%. Deux objectifs de caméras identiques de focale 75 mm sont utilisés pour relayer l'image de l'écran à phosphore sur la caméra, avec un grandissement de 1. On réalise du *binning* 2×2 c'est-à-dire que l'on fusionne quatre pixels pour augmenter la vitesse d'acquisition, sans dégrader la résolution spatiale de l'ensemble du dispositif de détection (car notre configuration optique permet un suréchantillonnage suffisant de l'image). Ce procédé revient à utiliser la caméra comme un détecteur avec 672×512 pixels carrés de côté 12,9 µm et de quasiment doubler la cadence d'acquisition (de 8,3 Hz à 16,4 Hz).

Une autre voie de détection est également présente sur le montage. Elle permet d'obtenir des images en intensité via une caméra EM CCD (*Electron Multiplier* CCD) du modèle *ImagEM* de *Hamamatsu*. Cette caméra détecte des signaux très faibles avec une surface sensible de 512×512 pixels carrés de 16 µm de côté, et est principalement utilisée pour des acquisitions d'images d'intensité de fluorescence à cadence vidéo. La réponse spectrale de ce capteur offre une efficacité quantique supérieure à 90% entre 500 et 650 nm.

Après être revenu sur les caractéristiques de notre détection FLIM en plein champ, nous allons décrire le dispositif dans son ensemble.

2.2 Schéma du montage

La combinaison des deux techniques de TIRF et de FLIM a abouti au développement d'un dispositif de microscopie de fluorescence en réflexion totale interne résolue en temps (Fig. 2.5).

L'excitation est réalisée par une source commerciale picoseconde supercontinuum (*Fianium*). Ces sources sont l'association d'un oscillateur à fibre émettant des impulsions ps dans l'infrarouge, d'un amplificateur à fibre dopée et d'une fibre hautement non linéaire permettant de générer le supercontinuum. Le réglage principal de ces systèmes commerciaux est le réglage de la puissance de pompe qui conditionne l'obtention des longueurs d'onde les plus courtes. Les premières expériences ont été faites avec une source ayant une cadence de 15 MHz et un large spectre (450-2500 nm).

Cependant, avec cette source, nous avons rapidement eu des problèmes liés à l'oscillateur, qui ont provoqué des détériorations du faisceau de sortie (qui n'apparaissait plus « blanc »). Nous avons donc opté pour le modèle standard, la source SC400-2 proposée par *Fianium*, avec une cadence de 20 MHz (Annexe II.1, Fig.2.1.1.A pour les spécifications) et un large spectre garanti entre 420 nm et 2200 nm (Annexe II.1, Fig. 2.1.1.B). La puissance sur tout le spectre est de 2 W.

Cette source nous permet de ne pas être limités dans la gamme de fluorophores que nous pouvons exciter. Nous avons juste à changer les filtres à l'excitation et à la détection en fonction du système étudié (F_{exc} et F_{det} sur la figure 2.5). Sur notre dispositif, ces différents filtres sont insérés dans des cubes *Semrock*, mis en place sur un plateau tournant dans la tourelle du microscope sous l'objectif. Ces cubes de filtres comportent les filtres à l'excitation, à la détection et la lame séparatrice pour les différents fluorophores que nous étudions tels que la GFP et la mCherry notamment. Ces systèmes sont particulièrement pratiques dans le cas de l'observation de double marquage. Cette accordabilité à l'excitation et la compatibilité avec les mesures en FLIM font de cette source supercontinuum un outil particulièrement adapté à des applications biologiques. En effet, sa cadence de 20 MHz et ses impulsions courtes (inférieures à 20 ps) nous permettent de mesurer des durées de vie de fluorescence entre 200 ps et 10 ns.

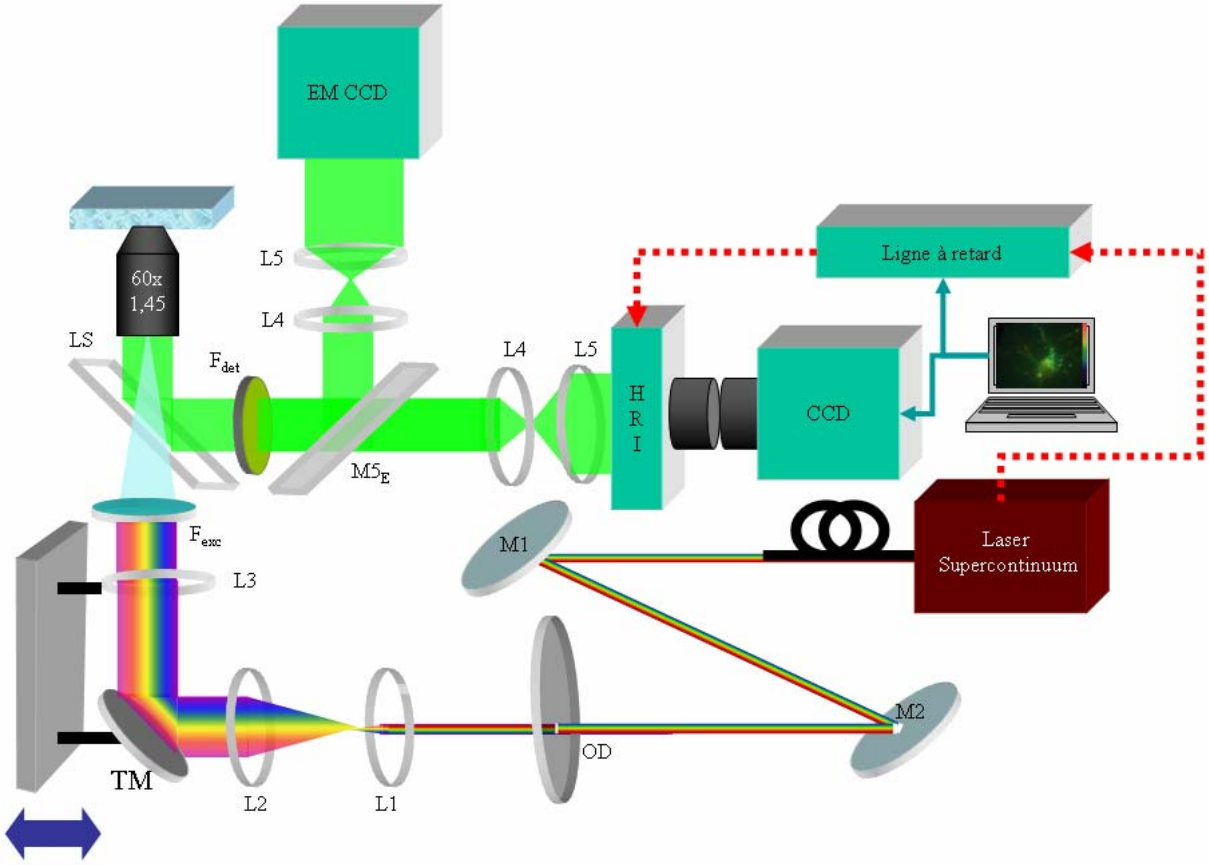


Fig.2.5: Montage expérimental.
M1, M2 : miroirs diélectriques hautement réfléchissants dans le visible.
TM : miroir diélectrique hautement réfléchissant dans le visible.
$M5_E$: miroir escamotable traité dans le visible pour passer d'une voie de détection à l'autre.
DO : densité optique ajustable.
F_{exc}, LS, F_{det} : filtre à l'excitation, lame séparatrice et filtre à la détection pour réaliser la sélection spectrale.
L1 : f =10mm ; L2 : f'=300mm ; L3 : f'=300mm ; L4 : f'=50mm ; L5 : f'=150mm.

Concernant la mise en place expérimentale, afin d'éviter toute réinjection de la composante infrarouge du laser dans l'oscillateur et de ne conserver que la composante visible, deux miroirs de renvoi *M1* et *M2* réfléchissants dans le visible filtrent cette composante (Fig. 2.5). Ils permettent aussi

de retrouver l'alignement en cas de déplacement de la source. Après le miroir *M2*, les fuites dans l'infrarouge sont récupérées et envoyées, par l'intermédiaire d'un miroir (avec un revêtement dans l'infrarouge), sur une photodiode pour récupérer le train d'impulsions du laser, qui va servir de signal de référence pour la détection temporelle.

A l'aide de la densité optique ajustable (roue avec une densité continûment variable de 0 à 4), nous pouvons maîtriser la puissance laser incidente sur l'échantillon. Typiquement pour les expériences avec des échantillons biologiques, nous travaillons avec une puissance de l'ordre de 500 µW, mesurée dans le plan focal arrière de l'objectif. Les deux lentilles *L1* et *L2* forment un afocal qui élargit le faisceau excitateur de façon à avoir au niveau de l'échantillon une zone d'excitation assez large et uniforme. La source laser n'étant pas polarisée, pour les mesures d'anisotropie de fluorescence (cf. chapitre IV), nous avons utilisé un polariseur et une lame demi-onde (Fig.2.6).

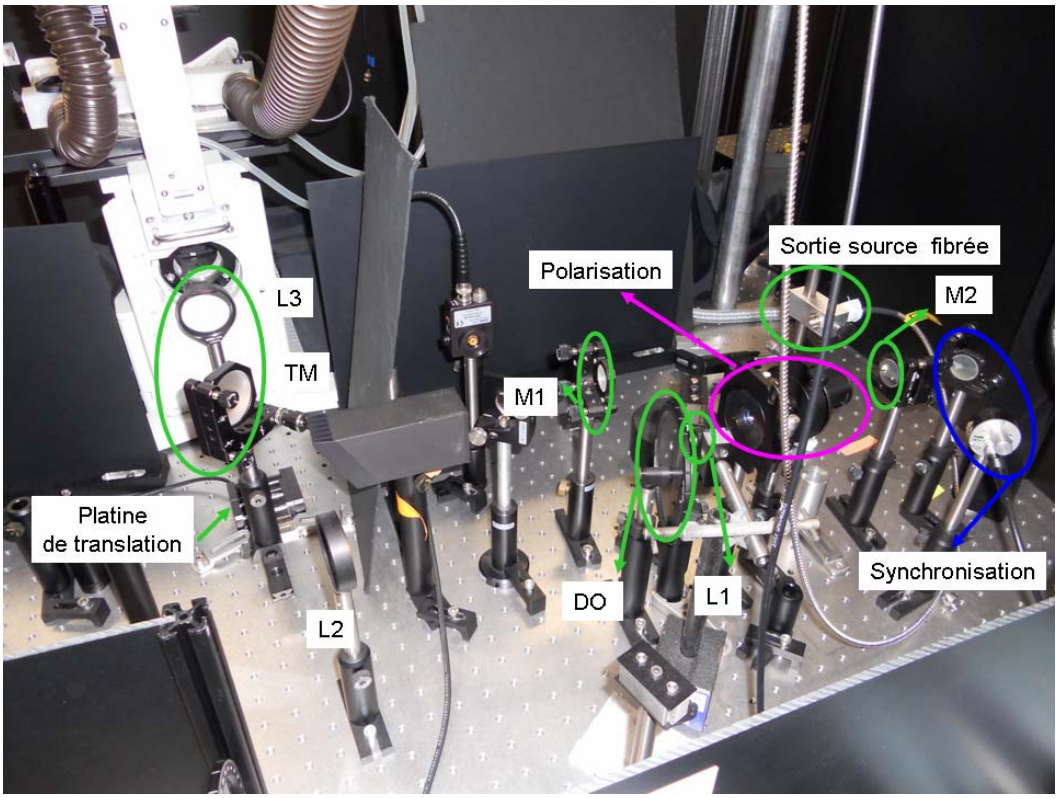


Fig.2.6: Photographie de la partie « mise en forme » du faisceau d'excitation.
La partie « synchronisation » regroupe un miroir hautement réfléchissant dans l'infrarouge et une photodiode qui nous permettent de récupérer le train d'impulsions du laser. La partie « polarisation » regroupe un polariseur et une lame demi-onde (cette partie sera détaillée dans le chapitre IV).

La partie du dispositif permettant de réaliser l'excitation en réflexion totale interne est constituée de l'objectif 60x à grande ouverture numérique (1,45 ou 1,49 en fonction des applications), du miroir *TM* et de la lentille *L3*. La lentille *L3* permet de focaliser le faisceau excitateur dans le plan focal arrière de l'objectif. Un rail est utilisé pour garantir le centrage de la lentille par rapport à l'axe défini par le microscope, et permettre d'avancer ou de reculer la lentille pour bien focaliser l'excitation dans le bon plan. Précédemment, le miroir *TM* permettait de modifier l'angle d'incidence du faisceau sur la lentille *L3* et ainsi de décaler la position du point de focalisation du laser dans le plan focal arrière de l'objectif, ce qui augmentait l'angle d'incidence à l'interface lamelle/échantillon. En tournant ce miroir et en augmentant l'angle, nous passions d'une excitation en épifluorescence classique à une excitation en réflexion totale interne. En modifiant cet angle, nous pouvions jouer sur la profondeur de pénétration du champ évanescent. Cependant, ce contrôle de l'angle de TIRF effectué manuellement en utilisant une vis micrométrique ne permettait pas d'obtenir une mesure suffisamment

précise de l'angle de TIRF pour nous assurer une bonne reproductibilité. De plus, nous ne pouvions pas mesurer et contrôler expérimentalement la profondeur de pénétration du champ.

Dans ce but, j'ai mis en place une platine de translation automatisée sur laquelle sont montés le miroir *TM* et la lentille de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif. Ce dispositif permet de contrôler l'angle d'incidence, en ajustant précisément l'arrivée du faisceau laser focalisé sur la pupille arrière de l'objectif. Ainsi, au lieu de tourner le miroir (ce qui induit une asymétrie sur le faisceau), il suffit de translater latéralement l'ensemble du rail via la platine contrôlée sous *Labview*. Cela va modifier la position latérale du point de focalisation du laser dans le plan focal arrière de l'objectif (Fig.2.7) et induire une modification de l'angle d'incidence du laser sur l'échantillon. On peut ainsi passer d'une excitation en épifluorescence à une excitation en TIRF avec différentes profondeurs de pénétration. La position du point de focalisation est alors ajustable et reproductible grâce à la platine de translation.

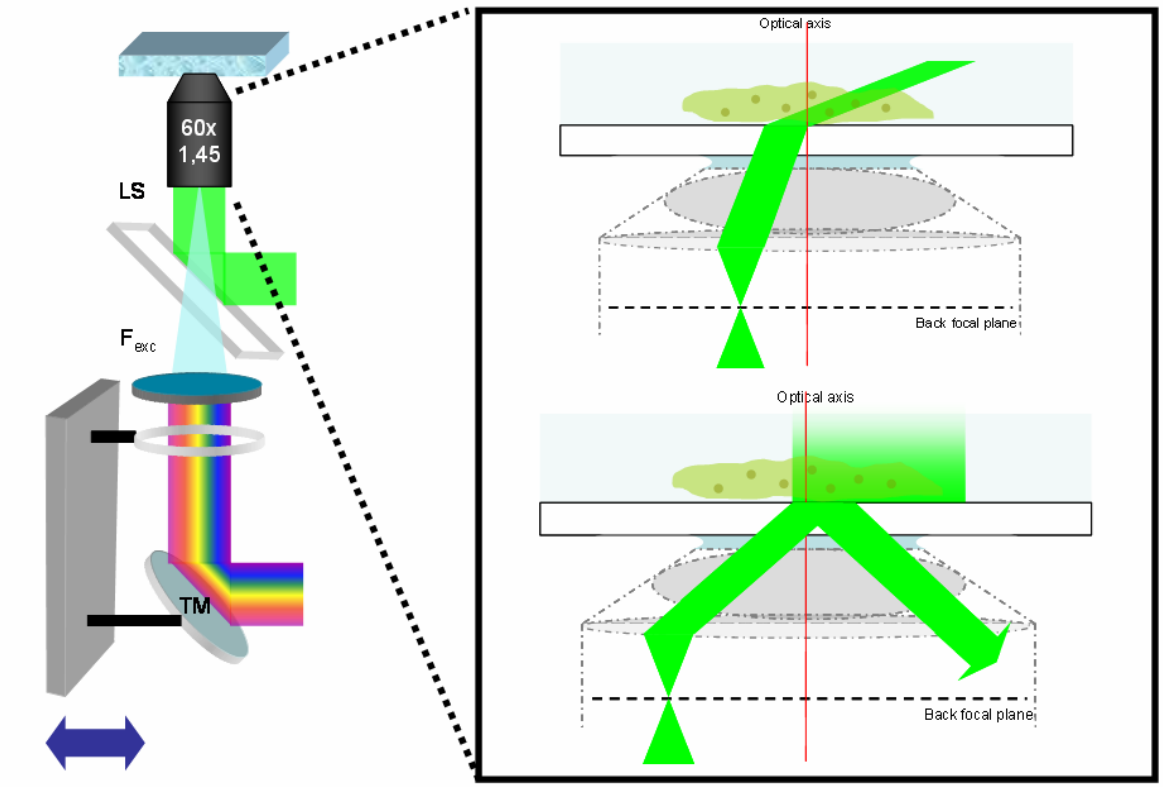


Fig.2.7: Schéma de la partie TIRF du dispositif qui se compose de l'objectif à grande ouverture numérique, d'une lentille de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif et d'un miroir. Ces deux derniers éléments sont montés sur une platine de translation motorisée permettant de passer d'une excitation en épifluorescence à une excitation en TIRF avec différentes profondeurs de pénétration.

Après la lentille *L3*, le faisceau rentre dans le bâti du microscope et un jeu de filtres positionnés dans un cube va permettre d'exciter le fluorophore souhaité. L'observation est faite avec un objectif *Olympus* 60x avec une ouverture numérique de 1,45 pour les expériences réalisées sur les échantillons biologiques (cf. chapitre III) et avec un objectif *Nikon* 60x et une ouverture numérique de 1,49 pour les expériences utilisant des surfaces plasmoniques (détaillées par la suite), ainsi que pour les expériences d'anisotropie de fluorescence (cf. chapitre IV).

Le signal de fluorescence est ensuite envoyé sur les deux voies de détection présentées précédemment. Sur chacune des voies, avant les détecteurs, deux lentilles *L4* et *L5* qui forment un télescope, permettent d'augmenter la taille de l'image sur le détecteur d'un facteur 3. Ce télescope est indispensable sur la voie de détection en durée de vie pour s'assurer que l'objectif et non l'intensificateur, limite la résolution spatiale des images [109]. La référence temporelle pour la

détection résolue en temps est le train d'impulsions récupéré par la photodiode après le miroir *M2*. Grâce à une ligne à retard pilotée par l'ordinateur, l'ouverture de la porte temporelle est déclenchée à différents instants après l'impulsion, ce qui va permettre ensuite de reconstruire le déclin de fluorescence (Fig. 2.8).

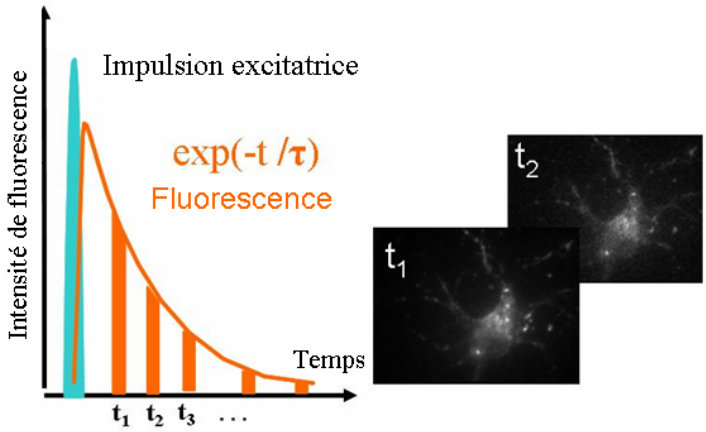


Fig.2.8 : Principe du FLIM dans le domaine temporel avec une détection à déclenchement contrôlé. Pour une première impulsion, un délai t_1 est appliqué entre l'impulsion et l'acquisition ; puis pour une seconde impulsion un délai t_2 est appliqué entre l'impulsion et l'acquisition, etc…

Etant donné que ce dispositif vise à observer des échantillons biologiques et à suivre des interactions entre protéines, nous avons mis en place un incubateur (PECON) permettant de faire des mesures dans les conditions physiologiques des cellules c'est-à-dire à 37°C et sous 5% de CO_2 (Fig.2.9). En effet, ces conditions jouent énormément sur l'activité cellulaire.

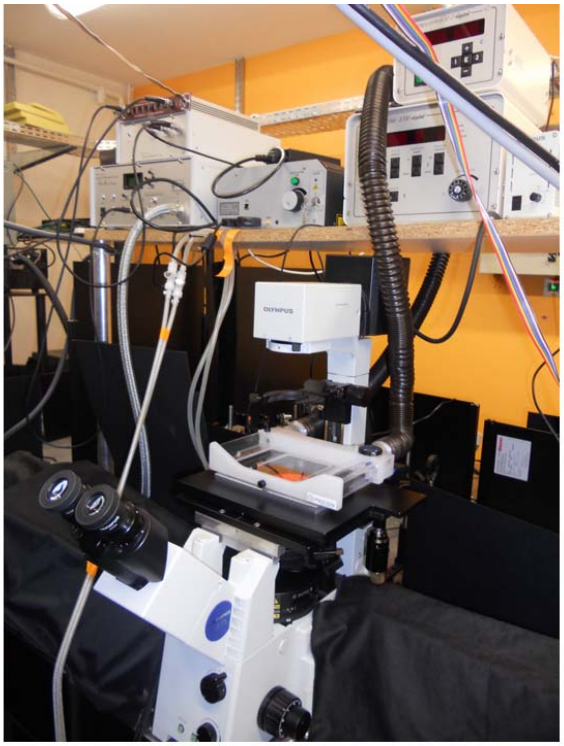


Fig.2.9 : Photographie du microscope TIRFLIM et de l'incubateur.

Avec ce microscope TIRFLIM, nous pouvons donc effectuer des mesures en intensité et en durée de vie de fluorescence sur des échantillons biologiques, dans leur environnement physiologique.

Des exemples de cartes de durée de vie de fluorescence obtenues sur la cellule précédente (Fig.2.4) sont présentés dans la figure ci-dessous pour les deux types d'excitation.

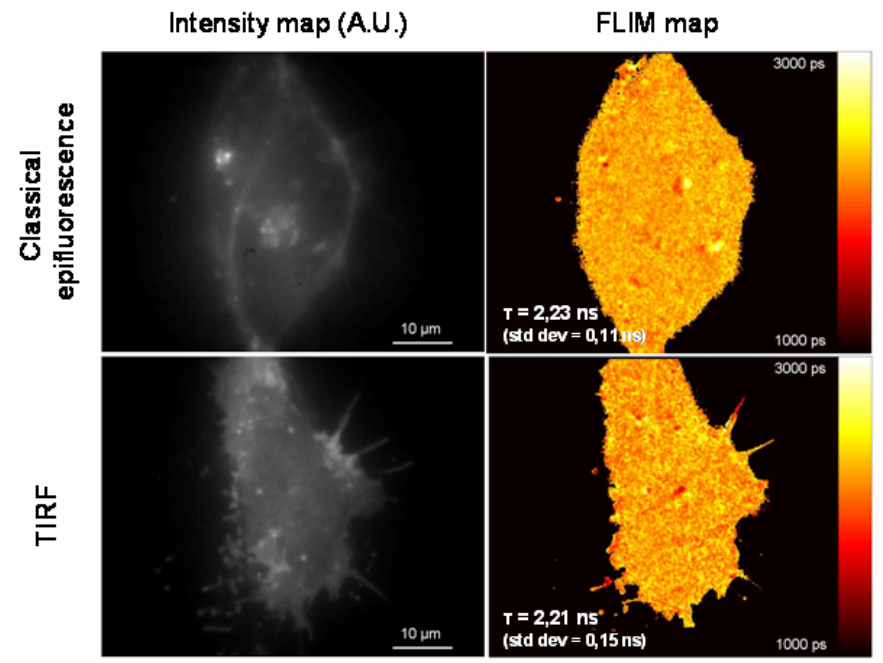


Fig.2.10: Mesures en intensité et en durée de vie de fluorescence effectuées sur une cellule HEK-293-C9 exprimant CB1R-GFP sous une excitation en épifluorescence et en TIRF. τ représente la durée de vie de fluorescence moyenne de la cellule, std dev correspond à l'écart-type associé à cette mesure.

On constate que la répartition des durées de vie de fluorescence est homogène pour les deux types d'excitation (Fig.2.10). Nous avons mesuré des durées de vie de fluorescence moyenne de 2,23 ± 0,11 ns dans le cas d'une excitation en épifluorescence et de 2,21 ± 0,15 ns dans le cas d'une excitation en TIRF. Les écarts-types sont de façon générale plus importants sous excitation TIRF par rapport à l'épifluorescence en raison du signal plus faible en illumination TIRF.

Le montage TIRFLIM ayant été présenté, nous allons nous intéresser aux modalités qui ont été choisies pour le traitement des signaux obtenus et pour extraire la durée de vie de fluorescence.

2.3 Interface pour le pilotage, l'acquisition et le traitement

Pour la détection résolue en temps, les programmes de pilotage, d'acquisition et de traitement ont été réalisés au laboratoire avec le logiciel *Labview*. Un premier programme permet d'acquérir les images qui vont ensuite être traitées par un second programme.

Concernant le programme d'acquisition, nous pouvons définir différents paramètres de la caméra CCD, comme le gain, le temps d'exposition, ainsi que le nombre d'acquisitions à moyenner pour obtenir une image. Ces deux derniers paramètres sont importants car l'écran à phosphore du HRI souffre d'un scintillement aléatoire des pixels qui génère du bruit, surtout lorsque le gain du HRI est élevé. En moyennant suffisamment les images ou en intégrant sur un temps assez long, on réussit à s'affranchir en grande partie de ce scintillement et à augmenter le rapport signal sur bruit des images. Les paramètres d'acquisition de la CCD ont été déterminés expérimentalement [109]. Nous avons ainsi choisi un nombre de 10 acquisitions de la CCD pour obtenir une image, chaque acquisition étant faite avec un temps d'exposition de 250 ms et un gain analogique ajustable de 0 à 10 (interfacé sur 8 bits dans le programme) pour la CCD.

Ce programme permet aussi de piloter la ligne à retard. L'ouverture de la «porte temporelle» est commandée en maîtrisant le temps passé depuis l'impulsion excitatrice. Pour réaliser un

échantillonnage convenable du déclin de fluorescence que l'on souhaite obtenir, il faut déterminer le nombre d'images et les « instants » auxquels on souhaite acquérir pour chaque image. Comme les déclins étudiés varient exponentiellement, il est nécessaire d'acquérir un plus grand nombre d'images avec des intervalles de temps plus courts, au début qu'à la fin du déclin. Le meilleur nombre de portes et le délai optimal entre les différentes acquisitions peuvent être prédits théoriquement [42]. Cependant, comme les études sont réalisées sur des échantillons vivants, le souci de réduire les temps d'acquisition a amené à choisir les algorithmes de manière plus empirique.

Dans le programme, il faut rentrer le tableau avec les valeurs de délai souhaitées par rapport à l'impulsion, et lorsque l'on lance le programme, les différentes acquisitions sont réalisées aux instants choisis et enregistrées dans un fichier. Ensuite, il faut traiter ces données. L'influence des différents paramètres d'acquisitions a été précédemment évaluée par l'équipe [109]. Pour la mesure de durée de vie de fluorescence, la position du début de l'échantillonnage est un paramètre important. En effet, nous avons choisi de partir directement du maximum d'excitation sans observer la montée du signal de fluorescence. Pour l'intensificateur, nous avons généralement utilisé le mode *Comb Low* avec des portes de 800 ps de largeur centrées sur les instants choisis pour l'échantillonnage. Dans ces conditions pour avoir une bonne estimation de la durée de vie de fluorescence, l'optimum pour la position du début de l'échantillonnnage semble être 400 ps après le maximum d'intensité. Pour l'intensificateur, nous avons également utilisé le mode *User 2* (portes temporelles de 4,5 ns de largeur) pour les échantillons présentant un signal de fluorescence peu intense. Dans chaque cas, le gain de l'intensificateur a été ajusté en fonction de l'échantillon observé et de son signal de fluorescence.

Le nombre de portes temporelles utilisées pour échantillonner le déclin de fluorescence variait (entre 13 portes et 30 portes environ) en fonction de l'échantillon. Comme nous le verrons par la suite pour les expériences de FLIM/FRET, nous avons utilisé un échantillonnage à 13 portes qui permettait de bien reconstruire le déclin de fluorescence (cf. chapitre III), alors que pour les expériences d'anisotropie de fluorescence (cf. chapitre IV), nous avons utilisé un nombre de portes plus important (30 portes), pour avoir une bonne restitution du déclin d'anisotropie de fluorescence. Cette variation du nombre de portes temporelles est liée au système observé. En effet, plus on augmente le nombre de portes temporelles utilisées pour échantillonner le signal, plus on améliore la précision de l'ajustement effectué pour le traitement de ces données. Cependant, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, nous risquons de photoblanchir l'échantillon en augmentant le nombre d'expositions à l'impulsion laser. Ce point est essentiel lors de l'observation d'échantillons biologiques. Il faut donc bien choisir les paramètres de l'échantillonnage du déclin de fluorescence de façon à obtenir une bonne précision sans pour autant dégrader l'échantillon en générant du photoblanchiment.

Le traitement est réalisé à l'aide d'un autre programme développé dans l'équipe en *Labview* (Fig.2.11). Il va ouvrir la pile d'images sélectionnée pour être traitée. Sur la première image d'intensité (l'image la plus près de l'excitation, donc la plus intense), on définit un seuil, choisi de manière à exclure le bruit de fond et les pixels les moins intenses, pour lesquels un signal d'intensité n'est mesuré que sur les toutes premières acquisitions ce qui fausse la détermination du temps de vie. On dessine également une région d'intérêt dans laquelle les calculs seront effectués. Puis, les calculs sont réalisés pixel par pixel par le programme. Dans un premier temps, il ajoute les intensités de toutes les images de la pile pour obtenir une « image d'intensité ». Puis dans un second temps, il ajuste le déclin associé à chaque pixel par un modèle de déclin mono-exponentiel. Le calcul est réalisé avec l'algorithme de Levenberg-Marquardt qui est une méthode d'ajustement par les moindres carrés [52]. Pour ce modèle, on ne considère qu'une seule espèce avec une seule durée de vie moyenne. Bien entendu, d'autres ajustements plus complexes, de type multi-exponentiel, sont possibles en retravaillant les déclins bruts obtenus. Ce modèle offre le temps de traitement le plus court, et nous permet d'avoir rapidement une bonne estimation du temps de vie de fluorescence.

Le programme affiche également les images d'intensité et de durée de vie en fausses couleurs, suivant les paramètres d'affichage (contraste, brillance, etc…) choisis par l'utilisateur. De plus, il calcule le temps de vie moyen de la zone sélectionnée et l'écart-type, rapporte la distribution des durées de vie sur l'ensemble de la carte sous forme d'un histogramme. Nous pouvons également

afficher, pour chaque pixel, les valeurs expérimentales ainsi que l'ajustement mono-exponentiel et les résidus correspondants. Ce calcul effectué pixel par pixel nous permet d'observer localement l'évolution de la durée de vie de fluorescence, ce qui peut être intéressant lorsque les systèmes étudiés présentent des hétérogénéités comme dans les échantillons biologiques par exemple (ex : vésicules, endosomes…).

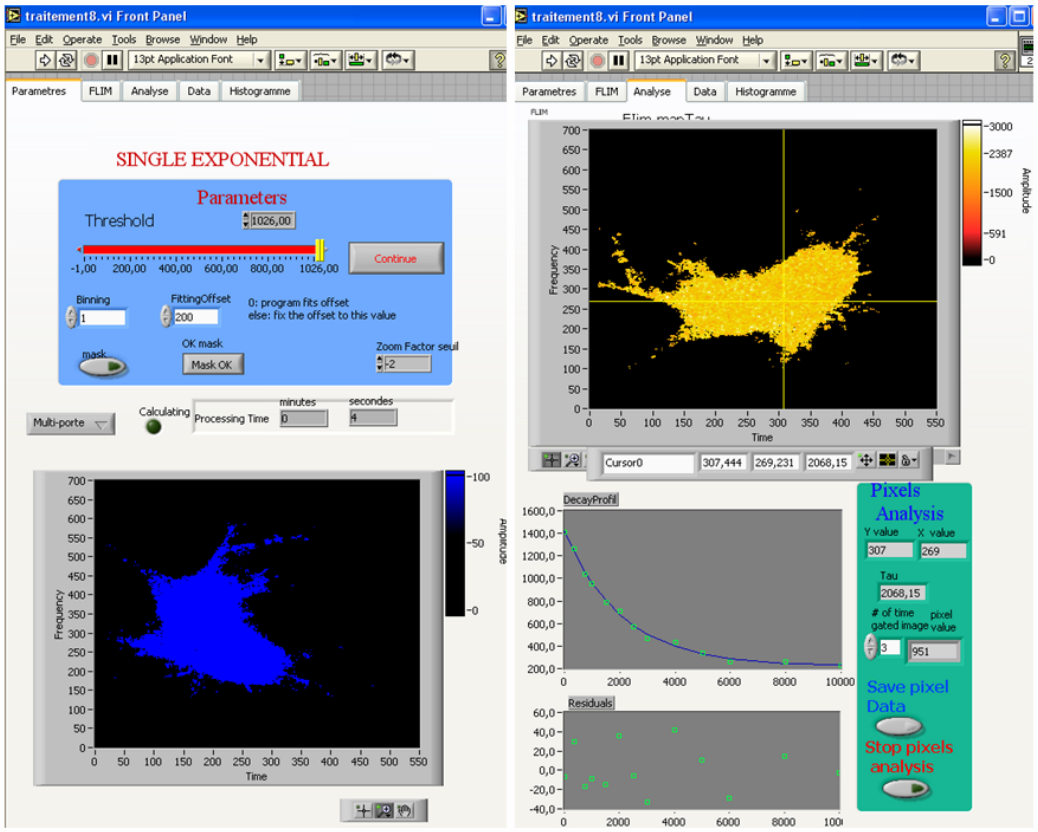


Fig.2.11 : Impressions d'écran du logiciel de traitement. Exemple de mesure de durée de vie de fluorescence sur un neurone d'hippocampe d'embryons de rat co-exprimant BACE1-GFP et APP-mCherry.

Un autre mode de représentation a été choisi (*Photon-weighted images*, Fig.2.12.C), afin d'avoir sur la même image les informations en intensité (Fig.2.12.A) et en durée de vie de fluorescence (Fig.2.12.B), pour obtenir une meilleure localisation du signal. Pour cette représentation, aucun seuillage n'est appliqué sur les images de durée de vie de fluorescence. Les images d'intensité moyenne et de durée de vie de fluorescence (ou d'anisotropie de fluorescence, cf. chapitre IV) sont combinées en considérant que l'image d'intensité correspond à la luminance et l'image de durée de vie de fluorescence correspond à la couleur (standard HSV, *Hue Saturation Value*).

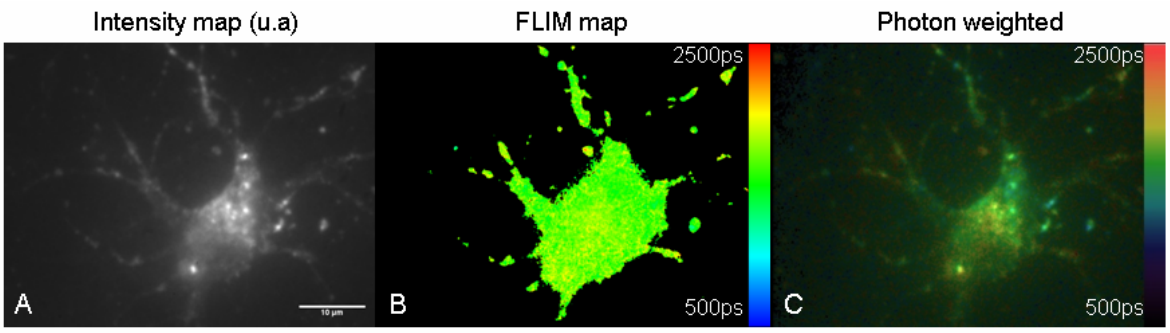


Fig.2.12 : Neurone d'hippocampe d'embryons de rat mis en contact avec la toxine cholérique marquée à l'Alexa 488, observé sous excitation TIRF. Images en intensité (A), en durée de vie de fluorescence (B) et « photon-weighted image » (C).

2.4 Mesures de durée de vie de fluorescence sous excitation TIRF et en épifluorescence : effet de l'interface

Nous avons tout d'abord cherché à voir s'il existait une différence dans les mesures de durée de vie de fluorescence de la GFP, sous excitation en épifluorescence ou TIRF. En effet, les propriétés d'émission d'un fluorophore placé sur un substrat diélectrique transparent à l'interface entre l'eau et le verre vont être modifiées [21]. De plus, la distribution angulaire de l'émission dépend fortement de l'orientation de la molécule (assimilable à un dipôle) par rapport à l'interface et de sa distance par rapport à cette interface (Fig.2.13).

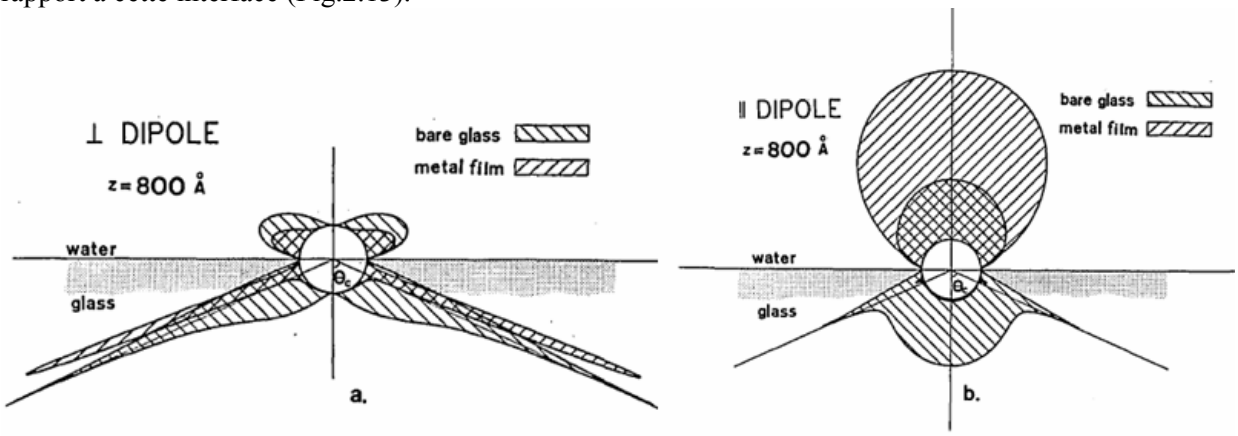


Fig.2.13: Distribution angulaire de l'intensité de fluorescence d'un dipôle placé à l'interface eau/verre, avec ou sans une couche d'aluminium de 22 nm déposée sur le verre. Le dipôle est perpendiculaire (a) ou parallèle (b) à l'interface [110].

Ainsi pour un dipôle à proximité d'une surface (d < 100nm), il peut y avoir des couplages de type champ proche. Les fortes discontinuités de l'indice de réfraction à l'interface entre l'eau et le verre (Fig.2.13) produisent un maximum d'émission dans la direction de l'angle critique de réflexion totale interne. Ces modifications des processus d'émission vont générer des différences de durée de vie de fluorescence. Sur une surface de verre pour des fluorophores à l'interface, on observera une diminution de la durée de vie de fluorescence entre 5 et 10%. En revanche, sur le métal la diminution sera drastique [110].

Nous avons cherché à voir si ce résultat était valable dans le cas de cellules observées *ex vivo,* excitées en épifluorescence ou en TIRF. Ces expériences ont dans un premier temps étaient effectuées sur des cellules HEK-293-C9. Des mesures ont été faites sur une quinzaine de cellules mais n'ont pas abouti à des résultats concluants. La différence observée entre les mesures de durée de vie en épifluorescence et en TIRF n'était pas suffisamment significative et ne sortait pas de l'erreur de mesure. De plus, ces expériences ont été faites avant l'acquisition de l'incubateur. Les cellules n'étaient donc pas dans leur condition physiologique (37°C, 5% de CO_2), ce qui joue énormément sur la durée de vie de fluorescence, très sensible aux conditions environnementales.

Nous avons finalement décidé de faire ces mêmes mesures sur des cellules HEK-293 transfectées avec la protéine APP marquée à GFP, dont le rôle sera explicité dans le chapitre III. Nous avons constaté que les écarts de durée de vie de fluorescence de la GFP entre les mesures en TIRF et celles en épifluorescence étaient faibles et souvent inclus dans l'erreur de mesure pour les cellules HEK-293. Nous n'avons donc pas réussi à mettre en évidence un raccourcissement significatif de la durée de vie de fluorescence lié à l'interface, lorsque nous n'excitons que les 100 premiers nanomètres de la cellule. En revanche, dans un autre type cellulaire (neurone d'hippocampe d'embryons de rat), nous avons pu observer un raccourcissement de la durée de vie de fluorescence de l'ordre de 100 ps lors du passage d'une excitation en épifluorescence à une excitation en TIRF (cf. chapitre III). Cela montre bien que l'interface peut induire des modifications de la durée de vie de fluorescence mais celle-ci reste néanmoins très sensible aux différents facteurs environnementaux (température, CO_2,…). De plus, l'observation d'organismes vivants introduit une nouvelle source d'incertitude intrinsèque

aux hétérogénéités de chaque cellule, ce qui peut également induire des artefacts de mesure. Cet effet montre bien à quel point il est nécessaire d'effectuer des mesures de référence de durée de vie de fluorescence pour chaque condition d'excitation (en TIRF et en épifluorescence) pour évaluer ainsi l'effet de l'interface sur la durée de vie de fluorescence afin de ne pas le confondre avec un phénomène biologique.

3 Calibrations et optimisation du dispositif TIRFLIM

Dans le but de contrôler tous les paramètres du dispositif TIRFLIM, nous avons effectué des mesures de calibration pour bien connaître les performances du montage en terme de résolution spatiale notamment. Nous avons également cherché à évaluer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

3.1 Calibration de la voie de détection résolue en temps

L'influence des différents paramètres d'acquisition de la voie de détection résolue en temps sur les mesures de temps de vie a été déterminée préalablement à cette étude [109]. Cela a permis de s'assurer que les éléments de détection ont une réponse qui varie linéairement avec l'intensité incidente, ainsi les modifications des intensités de fluorescence mesurées proviennent bien de l'échantillon et non du système de détection. Il a été vérifié que le nombre d'images moyennées pour obtenir une image finale, le gain, le temps d'exposition de la CCD ne perturbaient pas la mesure d'intensité tant que le détecteur n'était pas saturé. Pour l'intensificateur, l'intensité du signal détecté varie linéairement avec la largeur des portes temporelles.

Dans le souci de calibrer le dispositif, nous avons cherché à déterminer la dernière fréquence spatiale (fréquence spatiale de coupure) que nous pouvons résoudre avec la détection résolue en temps (HRI+Caméra CCD), en fonction de la largeur de la porte temporelle. En effet, en fonction de la largeur de la porte temporelle souhaitée, la tension pour la créer au niveau de l'intensificateur est appliquée soit sur la photocathode soit sur la « mesh gating », (cf. Fig.1.10). Cela génère des différences de résolution spatiale au niveau de l'intensificateur que nous avons calibrée. Pour cela, nous avons utilisé une mire USAF (Annexe II.1, Fig.2.1.2). Nous avons acquis une image du plus petit élément possible de la mire sur la caméra CCD, en utilisant un objectif 5x. Nous avons considéré qu'un élément de la mire n'était pas résolu si l'amplitude de la modulation sur l'image obtenue, était inférieure à 10% de l'amplitude maximale (Fig.2.14). Grâce aux spécifications de la mire (Annexe II.1, Tab.2.1.1), nous en avons déduit la fréquence de coupure objet (en paires de lignes/mm soit en mm^{-1} étant donné qu'une période correspond à une paire de ligne).

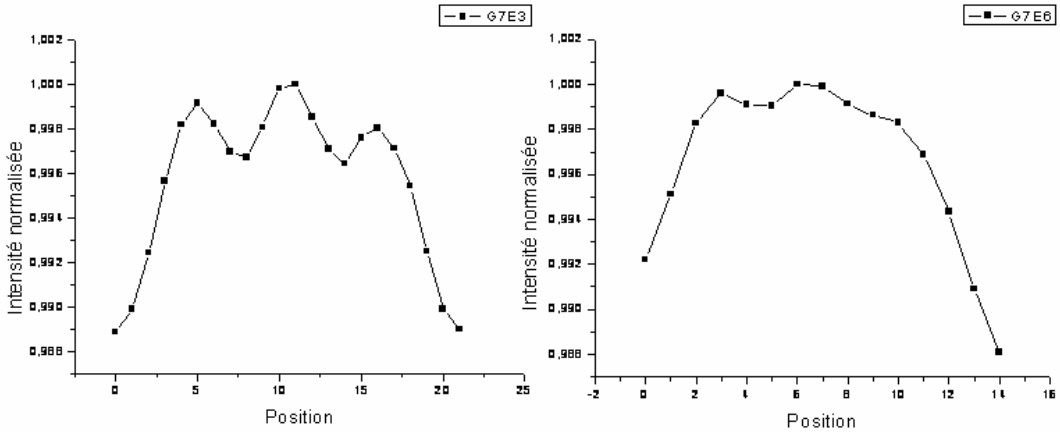


Fig.2.14: Profils obtenus pour différents modes de fonctionnement de l'intensificateur.
A droite : Profil obtenu sur l'élément 3 du groupe 7 de la mire USAF avec le mode Comb Low avec des portes de 800 ps ; la fréquence est résolue, le critère étant vérifié
A gauche : Profil obtenu sur l'élément 6 du groupe 7 de la mire USAF avec le mode Comb Low avec des portes de 1000 ps ; la fréquence n'est pas résolue, le critère n'étant pas vérifié.

Pour connaître la fréquence de coupure image (au niveau de l'intensificateur), il suffit de diviser la fréquence de coupure objet par le grossissement de la ligne de détection. Dans un premier temps, nous avons mesuré le grossissement de la chaîne de détection en imageant des éléments de la mire et en utilisant différents modes d'acquisition (Annexe II.1, Tab.2.1.2). Nous avons obtenu une valeur moyenne de grossissement de 12,6 alors que la valeur théorique est de 15 (étant donné que nous utilisions un objectif 5x corrigé à l'infini, couplé à un télescope qui a un grandissement de 3). Cet écart par rapport à la valeur théorique peut être dû à la présence d'optiques non maîtrisées (telles que la lentille de tube du microscope) mais également au télescope. Connaissant le grossissement réel (G_{FLIM} = 12,6), nous avons mesuré les fréquences de coupure objet, dans le plan de la mire, et image dans le plan de l'intensificateur (Annexe II.1, Tab.2.1.3). Nous avons constaté que la fréquence de coupure croît avec la largeur de la porte temporelle (Fig.2.15). La résolution minimale garantie de l'intensificateur est de 10 lignes/mm et nous retrouvons ce résultat expérimentalement. En augmentant la largeur de la porte temporelle, nous pouvons résoudre des éléments avec des fréquences spatiales plus grandes (jusqu'à 18 lignes/mm). Cette mesure de la fréquence de coupure de la ligne de détection résolue en temps permet de connaître les limites du montage et de savoir dans quelles conditions on peut acquérir une image. Ainsi, pour des portes temporelles de 800 ps de largeur, nous avons obtenu une fréquence de coupure de 16 lignes/mm au niveau de l'intensificateur, ce qui correspond dans le plan objet à 0,42 µm (avec G_{FLIM} = 60 × 2,5 = 150 pour l'objectif 60x). Connaissant nos limites liées à l'intensificateur, nous allons maintenant nous intéresser à nos limites en terme de résolution spatiale sur le microscope TIRFLIM.

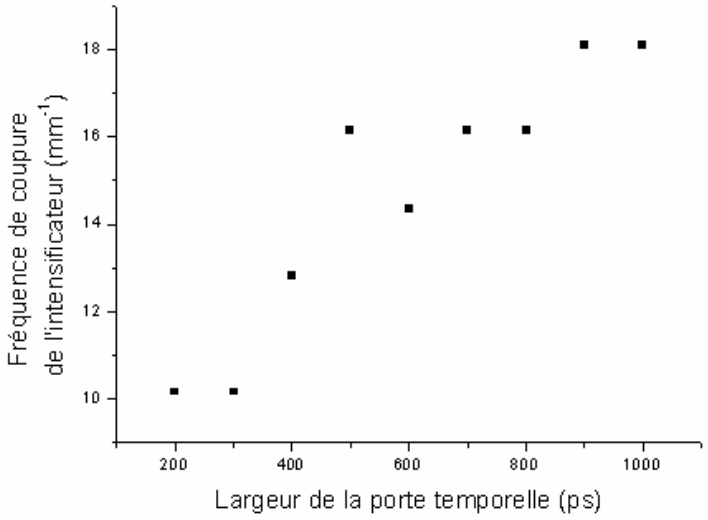


Fig.2.15: Variations de la fréquence de coupure de la détection résolue en temps en fonction de la largeur de la porte temporelle.

3.2 Calibrations : mesure de la résolution spatiale en illumination en épifluorescence et en TIRF

Nous avons mesuré les résolutions latérale et axiale du dispositif en observant des microsphères de 100 nm de diamètre (*Fluosphere Carboxylate Modified Microspheres, Invitrogen*), fixées dans un gel d'agarose. Ces billes ont un diamètre inférieur à la limite de résolution du système ce qui permet d'avoir accès aux fonctions de réponse instrumentale du microscope (réponse percussionnelle). Les billes s'excitent à 505 nm et fluorescent à 515 nm. Nous les avons observées avec le cube de filtres FITC dont le filtre à l'excitation est centré à 490 nm et le filtre à l'émission est centré à 520 nm. Les mesures de résolutions axiale et latérale ont été effectuées en épifluorescence et en TIRF de façon à comparer les performances du montage dans ces deux configurations. Pour la détection, nous avons utilisé la voie constituée de l'intensificateur et de la caméra CCD (voie FLIM) et

nous avons choisi le mode *User2*, étant donné la faiblesse du signal de fluorescence. Il permet d'ouvrir des portes temporelles de 4,5 ns de largeur et de collecter ainsi plus de signal.

3.2.1 Résolution latérale

D'après la théorie d'Abbe, le rayon de la réponse percussionnelle qui définit la résolution latérale est donné par :

$$r_{lateral} = \frac{1{,}22 \times \lambda_{em}}{2ON} \tag{2.23}$$

où λ_{em} est la longueur d'onde d'émission. Dans notre cas, étant donné que $\lambda_{em} = 515\ nm$ et que nous travaillons avec l'objectif 60x d'ouverture numérique égale à 1,45, nous en déduisons une largeur théorique $r_{lateral} = 217$ nm pour la réponse percussionnelle. Cette valeur correspond au cas idéal , pour un fluorophore en contact direct avec la lamelle de verre et constitue la limite basse. Ainsi dans le cas de fluorophores placés dans un gel ou dans une solution aqueuse, la situation sera équivalente à l'utilisation d'un objectif dont l'ouverture numérique est de l'ordre de 1,33.

Expérimentalement, nous avons tracé le profil de billes observées à la meilleure mise au point. Nous avons ensuite utilisé un ajustement gaussien (Fig.2.16). La largeur à mi-hauteur des profils ainsi obtenus donne la résolution latérale expérimentale. Cette mesure a été effectuée pour une vingtaine d'acquisitions que ce soit en illumination TIRF ou en épifluorescence. Nous avons constaté que les valeurs moyennes expérimentales de résolution latérale obtenues en épifluorescence (468 ± 52 nm) ou en TIRF (393 ± 20 nm) étaient supérieures à la valeur théorique (217 nm) (Tab.2.1). Ceci semble cohérent car la réponse percussionnelle est perturbée par un certain nombre d'éléments optiques (une lentille de tube incluse dans le bâti, les lentilles constituant le télescope placé devant l'intensificateur) mais aussi par la porte temporelle, qui la dégrade. Les mesures sont cohérentes avec les résultats obtenus dans la partie précédente lors de la mesure des fréquences de coupure au niveau de l'intensificateur.

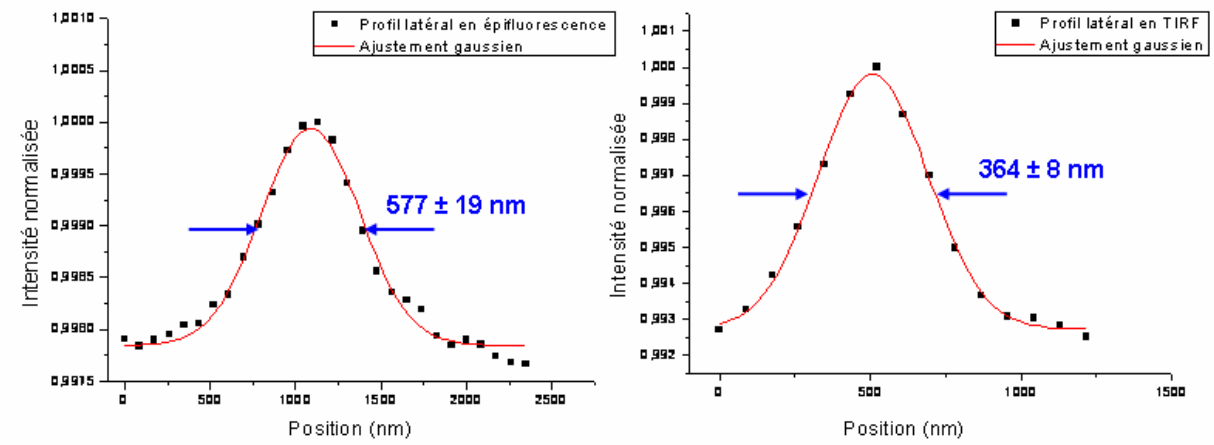


Fig.2.16: Exemples de profils d'intensité de bille de 100 nm observée sur la voie résolue en temps en excitation en épifluorescence (à gauche) et en TIRF (à droite). La largeur à mi-hauteur vaut 577 ± 19 nm en épifluorescence et 364 ± 8 nm en TIRF. Les erreurs correspondent aux erreurs sur l'ajustement gaussien effectué.

Nous remarquons par ailleurs que la valeur moyenne obtenue pour les acquisitions effectuées en épifluorescence (468 ± 52 nm) est plus élevée que celle obtenue en TIRF (393 ± 20 nm). Il ne devrait pas y avoir une telle différence entre les deux configurations mais cela peut s'expliquer par un bruit de fond plus important en épifluorescence, qui va dégrader la réponse percussionnelle et fausser ainsi la mesure lors du traitement.

3.2.2 Résolution axiale

La résolution axiale théorique est donnée par

$$r_{axial}(z) = \frac{2n\lambda_{em}}{ON^2}. \tag{2.24}$$

Cette grandeur correspond à la moitié de la longueur de la tache centrale dans la direction de l'axe optique. Etant donné que l'indice de la solution d'agarose dans laquelle se trouvent les billes est de 1,4, la longueur d'onde d'émission de fluorescence vaut 515 nm et l'ouverture numérique de l'objectif vaut 1,45, nous en déduisons que la résolution axiale théorique dans le cas idéal est de l'ordre de 686 nm dans nos conditions expérimentales.

Expérimentalement, afin d'évaluer la résolution axiale du montage, l'objectif a été monté sur une bague piézoélectrique (*PIFOC P721*) interfacé sous *LabView* afin de contrôler les déplacements axiaux de l'objectif. Une synchronisation et automatisation des déplacements en *z* avec l'acquisition des images en intensité et en durée de vie de fluorescence ont été mises en place dans le programme d'acquisition. La résolution des déplacements est inférieure au nanomètre et la bague piezoélectrique peut balayer jusqu'à 100 µm. Ce dispositif nous a permis de déplacer l'objectif axialement de façon contrôlée et d'acquérir à chaque étape des mesures soit en intensité soit en durée de vie de fluorescence pour les billes de 100 nm. Nous avons ainsi pu tracer les profils axiaux des billes (Fig.2.17), mesurer leur largeur à mi-hauteur en utilisant un ajustement gaussien pour en déduire la résolution axiale expérimentale. Les mesures ont été moyennées sur une vingtaine d'acquisitions.

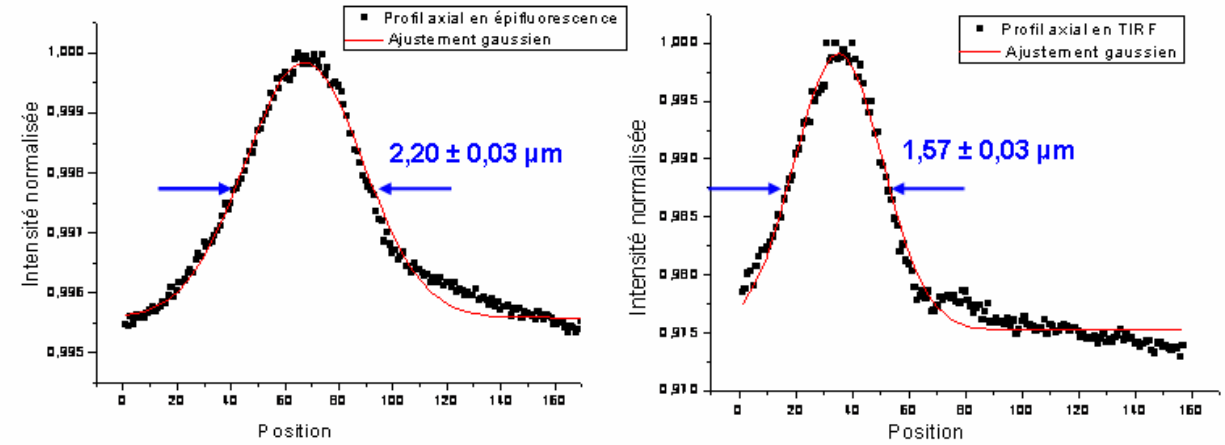


Fig.2.17: Exemple de profils d'intensité axiaux obtenus pour une bille de 100 nm en épifluorescence (à gauche) et en TIRF (à droite). La largeur à mi-hauteur vaut 2,20 ± 0,03 µm en épifluorescence et 1,57 ± 0,03 µm en TIRF. Les erreurs correspondent aux erreurs sur l'ajustement gaussien effectué.

Nous avons obtenu une largeur à mi-hauteur moyenne de 2,0 ± 0,5 µm (Tab.2.1) en épifluorescence. La valeur moyenne obtenue est plus élevée que la valeur théorique, en raison des optiques présentes qui dégradent la résolution.

Concernant la détermination de la résolution axiale en TIRF, la mesure effectuée du profil axial des billes (Tab.2.1), ne permet pas de sonder la profondeur de pénétration de l'onde évanescente qui définit la résolution axiale en excitation TIRF. En effet, étant donné que la résolution axiale du système est le produit de la PSF à l'excitation par la PSF à l'émission, sous une illumination TIRF, on aura un confinement à l'excitation mais la mesure de résolution axiale sera limitée par la détection. Il faut donc trouver d'autres techniques pour évaluer la résolution axiale « réelle » de l'excitation TIRF, comme nous le verrons par la suite en déterminant la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Cependant, avec ce modèle, on remarque déjà une différence significative de largeur à mi-hauteur des

profils axiaux des billes entre les deux types d'excitation, qui est en accord avec le fait que la résolution axiale soit meilleure sous excitation TIRF.

Largeur à mi-hauteur	Théorie	Epifluorescence	TIRF
Profil latéral (nm)	217	468 ± 52	393 ± 20
Profil axial (µm)	0,686	2,0 ± 0,5	1,3 ± 0,2

Tab.2.1: Tableau récapitulatif des résolutions latérale et axiale obtenues sous excitation en épifluorescence et en TIRF (valeur moyenne ± écart-type).

A la suite de ces différentes expériences, nous avons constaté que les résolutions axiale et latérale sont meilleures en TIRF par rapport à celles obtenues en épifluorescence. Ces informations permettent de connaître les caractéristiques du dispositif et ses limites en terme de résolution. Ces critères sont importants lorsque l'on veut faire de l'imagerie de phénomènes biologiques, il faut savoir si l'on sera capable de les résoudre.

La microscopie TIRF bénéficie d'une résolution sub-longueur d'onde, ce qui en fait un très bon outil pour l'observation de phénomènes membranaires dans les cellules. Comme nous l'avons vu précédemment, la résolution axiale de ce type de dispositif ne peut pas être déterminée de manière classique. Cette résolution est définie par la profondeur de pénétration de l'onde évanescente qui est générée lors de l'excitation TIRF. La connaissance de cette grandeur est un paramètre très intéressant pour certaines applications qui nécessiteraient de se positionner dans les 50, 100 ou 150 premiers nanomètres de l'échantillon de façon très reproductible.

Nous avons donc cherché à mettre en place une méthode efficace de calibration de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Différentes approches ont été suivies qui vont être exposées dans cette partie pour permettre une calibration plus simple de l'onde évanescente et également pallier aux défauts résiduels, comme la diffusion qui persiste en illumination TIRF.

3.3 Recherche de la profondeur de pénétration du champ évanescent

Pour calibrer le champ évanescent, nous avons suivi plusieurs approches. Dans un premier temps, nous avons cherché à l'évaluer sous une excitation TIRF grâce à des surfaces nanostructurées. Dans un second temps, nous avons utilisé des surfaces plasmoniques pour compléter ces résultats.

Ces expériences ont été faites en collaboration avec Emmanuel Fort, Karla Balaa, Yannick Goulam Houssen et Olivier Loison de l'Institut Langevin de l'ESPCI ParisTech. Les échantillons présentés par la suite ont été réalisés à l'Institut Langevin grâce à un bâti de dépôt ultravide fonctionnant par évaporation thermique [111]. Des dépôts de quelques nanomètres de différents matériaux (dont des métaux) peuvent ainsi être effectués sur ces surfaces.

3.3.1 Evaluation de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente sous excitation TIRF

Les premières mesures de calibration de l'onde évanescente ont tout d'abord été faites sous excitation TIRF en utilisant l'objectif d'ouverture numérique 1,45. Nous avons testé différents échantillons modèles et présentant un indice proche de l'eau, pour essayer d'obtenir un moyen fiable de calibration de l'onde évanescente. En effet, en utilisant un matériau avec un indice proche de celui de l'eau, on peut se placer dans des conditions de réflexion totale comparables à celles que l'on a lors de l'observation d'échantillons biologiques. Un des premiers types d'échantillons testés était constitué de dépôts de divers matériaux en escalier (THV Tetrafluoroethylene-Hexafluoropropylene-Vinylidene fluoride, polymère fluoré mais peu pratique car peu mouillant). Les lames étaient silanisées pour favoriser le mouillage. Ces marches très fines (20 nm à 200 nm d'épaisseur par palier de 20 nm) ont

été obtenues par évaporation thermique du matériau choisi et étaient recouvertes du fluorophore souhaité (des billes dans notre cas, Fig.2.18).

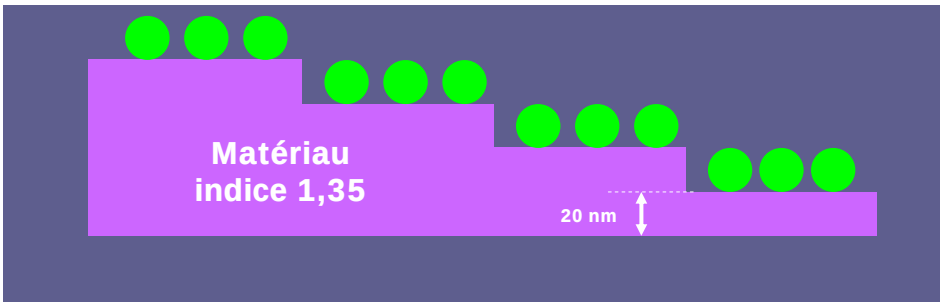


Fig.2.18: Schéma des échantillons utilisés pour détecter le champ évanescent [109].

En déposant des petites sphères fluorescentes (20 nm à 100 nm), on peut théoriquement retrouver le déclin mono-exponentiel du champ évanescent, suivant l'augmentation de la distance à l'interface et ainsi mesurer la profondeur de pénétration du champ. Expérimentalement, on cherche ainsi à mettre en évidence une diminution de l'intensité et une augmentation de la durée de vie de fluorescence des fluorophores avec l'éloignement de l'interface [110]. L'intérêt d'une telle calibration est de connaître précisément la partie de l'échantillon pour laquelle on acquiert une image. Comme les membranes plasmiques ont une épaisseur d'environ une dizaine de nanomètres, il est nécessaire d'évaluer plus finement la contribution de la fluorescence de la membrane au signal collecté. Cependant, pour nos applications actuelles, une précision à 10 nm près n'est pas cruciale. Néanmoins, d'un point de vue plus fondamental, une telle précision serait d'un grand intérêt pour étudier expérimentalement l'influence de la distance à l'interface sur le temps de vie de fluorescence mesuré.

Plusieurs échantillons ont ainsi été testés dans le but de mettre en évidence le déclin mono-exponentiel du champ. Nous avons observé des billes de 100 nm qui s'excitent à 580 nm et émettent à 605 nm (Fig.2.19). Pour cela, nous avons utilisé le cube de filtres TXRED (*Semrock*), dont le filtre à l'excitation est centré à 562 nm et le filtre à l'émission à 624 nm.

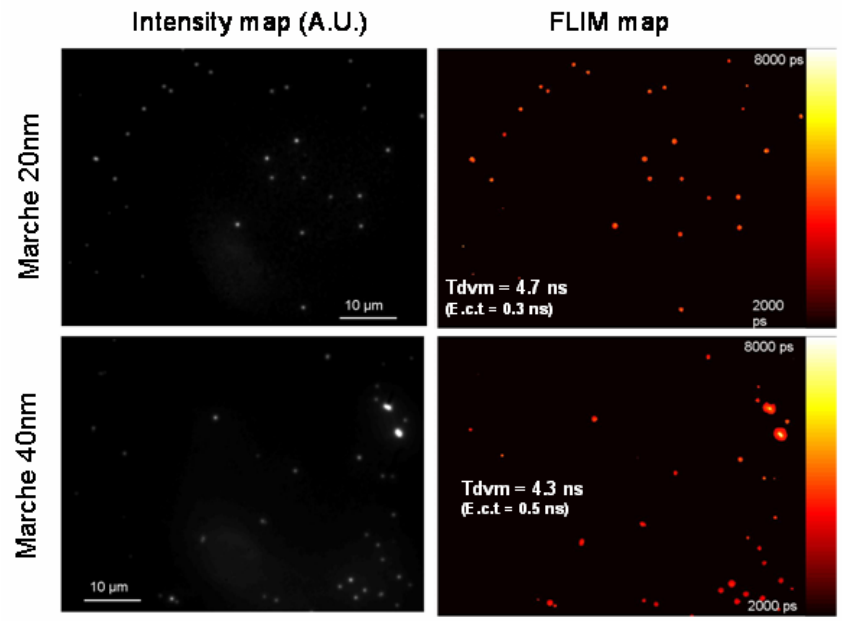


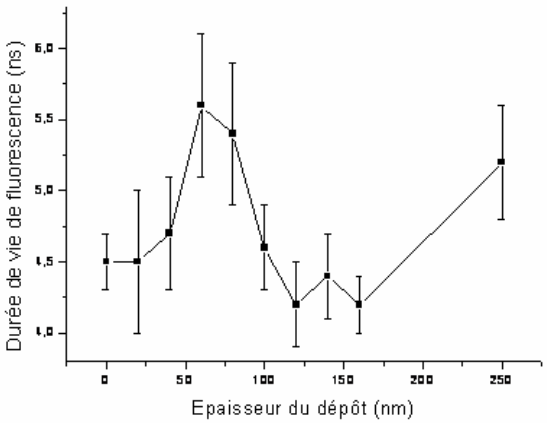
Fig. 2.19: Images en intensité et en durée de vie de fluorescence de billes posées sur des marches de 20 nm (en haut) et 40 nm (en bas) avec une excitation sous onde évanescente.
Tdvm : Temps de vie moyen, E.c.t : écart-type.

Les résultats sont consignés dans le tableau de la figure 2.20.A. Pour chaque échantillon, le gain de l'intensificateur a été fixé en effectuant des mesures de durée de vie de fluorescence sur la marche la moins haute pour pouvoir comparer les signaux de fluorescence. L'angle de TIRF est également fixe. Le nombre de portes utilisées pour l'acquisition a été optimisé expérimentalement de façon à obtenir les meilleurs ajustements possibles.

Nous avons bien observé une diminution de la durée de vie de fluorescence pour les plus faibles épaisseurs (marches entre 0 et 60 nm) [110]. Cependant, nous avons obtenu une diminution semblable par la suite pour de plus fortes épaisseurs (entre 100 et 150 nm), qui étaient inattendues. De plus, les erreurs de mesure étaient importantes (Fig.2.20.B). Or, plusieurs paramètres sont susceptibles de modifier la durée de vie mesurée. Tout d'abord, la position du fluorophore joue un rôle important et va fortement influencer la durée de vie de fluorescence. En effet, un fluorophore peut être modélisé par un dipôle et selon son orientation, la durée de vie de fluorescence associée variera. Plus il sera entouré d'un milieu de grand indice, plus le champ évanescent généré va décroître rapidement, comme la durée de vie. Des variations de durée de vie (de l'ordre de 10 à 15%) vont être observées suivant la position de la bille et des fluorophores excités dans la bille (excitation des fluorophores collés au polymère ou de ceux situés à 50 ou 100 nm par exemple). Cela pose un problème lorsque l'on utilise des billes de 100 nm posées sur des échantillons dont la différence d'épaisseur entre les marches ne fait que 20 nm.

Epaisseur du dépôt (nm)	Durée de vie moyenne (ns)	Ecart-type (ns)
0	4,5	0,2
20	4,5	0,5
40	4,7	0,4
60	5,6	0,5
80	5,4	0,5
100	4,6	0,3
120	4,2	0,3
140	4,4	0,3
160	4,2	0,2
250	5,2	0,4

A



B

Fig. 2.20: (A) Tableau récapitulatif des durées de vie moyennes sur les billes de 100 nm pour les différentes épaisseurs de marche. (B) Variations de la durée de vie de fluorescence des billes positionnées sur les marches en fonction de l'épaisseur du dépôt.

Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé les mêmes échantillons mais avec des billes de 20 et 50 nm. Cela permet en théorie d'obtenir une meilleure précision sur la mesure de durée de vie de fluorescence et sur les variations engendrées. Nous avons ainsi utilisé comme billes les *Fluorophore Carboxylate Modified Microsphere* (20 nm, yellow/green (505/515)) en utilisant le cube FITC. Cependant avec ce type d'échantillons nous avons rencontré deux difficultés. Tout d'abord, le signal était très faible avec ces petites billes, ce qui générait des erreurs importantes dans la mesure de durée de vie de fluorescence. De plus, ces billes avaient tendance à s'agréger rendant notre programme de traitement peu adapté notamment pour le seuillage.

Nous avons également essayé de calibrer le champ évanescent en mettant en évidence une différence d'intensité de fluorescence des billes positionnées sur deux marches successives. Toutefois, cette variation est faible et difficile à évaluer car les billes ne présentent pas une intensité homogène sur tout l'échantillon. Par ailleurs, ces échantillons « en marche » étaient difficiles à reproduire pour nos collègues de l'Institut Langevin et présentaient souvent beaucoup d'inhomogénéités de surface. Cela en faisait donc un dispositif peu adapté pour une calibration précise de l'onde évanescente. Cependant, l'apparition de nouveaux polymères (avec un indice proche de l'eau) offrant une plus

grande homogénéité de la surface des dépôts effectués et l'utilisation de marqueurs présentant un signal de fluorescence plus important (ex : QDs, etc…) relancent l'intérêt de cette approche pour mesurer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

Une autre technique a également été testée pour détecter le champ évanescent. Elle consiste à acquérir des images de billes de 10 µm tout en faisant varier l'angle de TIRF [112]. En augmentant l'angle d'incidence sur l'échantillon, on va ainsi diminuer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente sur la bille et on doit par conséquent observer une diminution du rayon du plan de la bille imagée (Fig.2.21).

Nous avons initialement utilisé des billes de 10 µm de diamètre (*Molecular Probes, fluospheres carboxylates modified microspheres*) qui s'excitent à 505 nm et fluorescent à 515 nm, fixées dans un gel d'agarose. Nous avons réalisé une série de coupes optiques selon l'axe *z* (pour plusieurs angles d'incidence sous excitation TIRF. Nous avons ensuite tracé le profil en intensité et mesuré la largeur à mi-hauteur. Les résultats n'ont pas été concluants. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence en raison de la diffusion qui parasitait toutes les mesures. Ce phénomène est lié à un problème d'adaptation d'indice entre les billes (n = 1,55) et la solution d'agarose (n = 1,4), qui induit une perte du confinement de l'onde évanescente. D'autres billes qui ne possèdent des fluorophores qu'à leur surface ont également été observées. Ces dernières permettent de limiter le bruit de fond et d'être ainsi plus précis sur la mesure. Cependant celles-ci étaient en polystyrène (n = 1,49) et nous avons également été perturbés par la diffusion en raison des différences d'indice. Des billes en silice ayant un indice beaucoup plus faible (n = 1,37) et proche de l'eau dans la même gamme de longueur d'onde ont également été testées. Néanmoins, nous n'avons pas observé de différences significatives des mesures des durées de vie de fluorescence en fonction de l'angle de TIRF et les mesures de la largeur à mi-hauteur du profil axial (diamètre apparent) étaient similaires. De plus, ces billes présentaient des tailles et des formes très aléatoires et non sphériques, rendant l'analyse des résultats complexe.

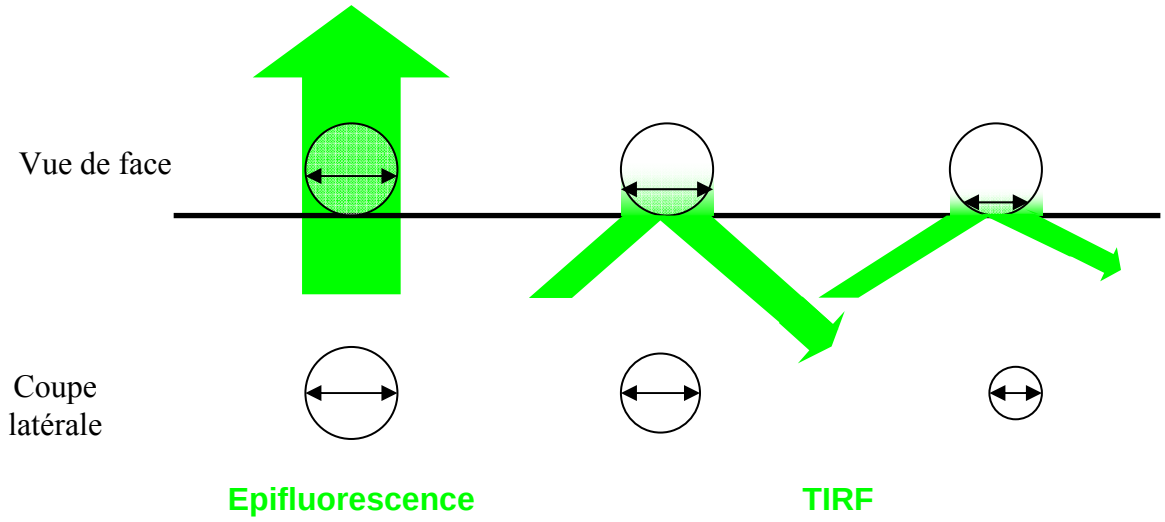


Fig.2.21: Schéma illustrant une méthode de mesure de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente avec des billes de 10 µm de diamètre. En épifluorescence, on excite toute la bille, dans le plan focal le rayon « apparent de la bille » doit être de 10 µm. Lorsque l'on excite les billes en TIRF en augmentant l'angle d'incidence, on doit constater que le rayon de la bille dans le plan focal (par conséquent la profondeur de pénétration de l'onde évanescente), diminue.

Etant donné que nous n'avons pas pu mettre en évidence le déclin mono-exponentiel du champ évanescent sous excitation TIRF, nous avons décidé d'utiliser des surfaces plasmoniques en se plaçant à l'angle de résonance du plasmon pour évaluer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. L'acquisition d'un objectif *Nikon* d'ouverture numérique 1,49, nous a permis d'accéder à une plus grande gamme angulaire à l'excitation et ainsi d'exciter les échantillons à l'angle de résonance du plasmon, comme nous allons le voir par la suite.

3.3.2 Utilisation de surfaces plasmoniques

Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux conditions nécessaires pour exciter les plasmons de surface d'un métal puis dans un second temps, nous verrons comment nous avons utilisé ces surfaces dans la recherche de l'évaluation de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

3.3.2.1 Conditions d'existence et relation de dispersion

La proximité d'une surface métallique va induire des modifications des processus de désexcitation radiative et non radiative d'un fluorophore. Ces phénomènes peuvent mettre en jeu les plasmons qui sont des oscillations collectives des électrons du métal (Fig.2.22.a) et qui peuvent induire de fortes exaltations locales du champ électrique [22]. Or, à une interface plane, le plasmon va pouvoir se coupler au champ électromagnétique. En contrôlant les interactions entre les fluorophores et les plasmons, on peut ainsi accroître les performances des techniques d'imagerie, comme nous allons le voir par la suite.

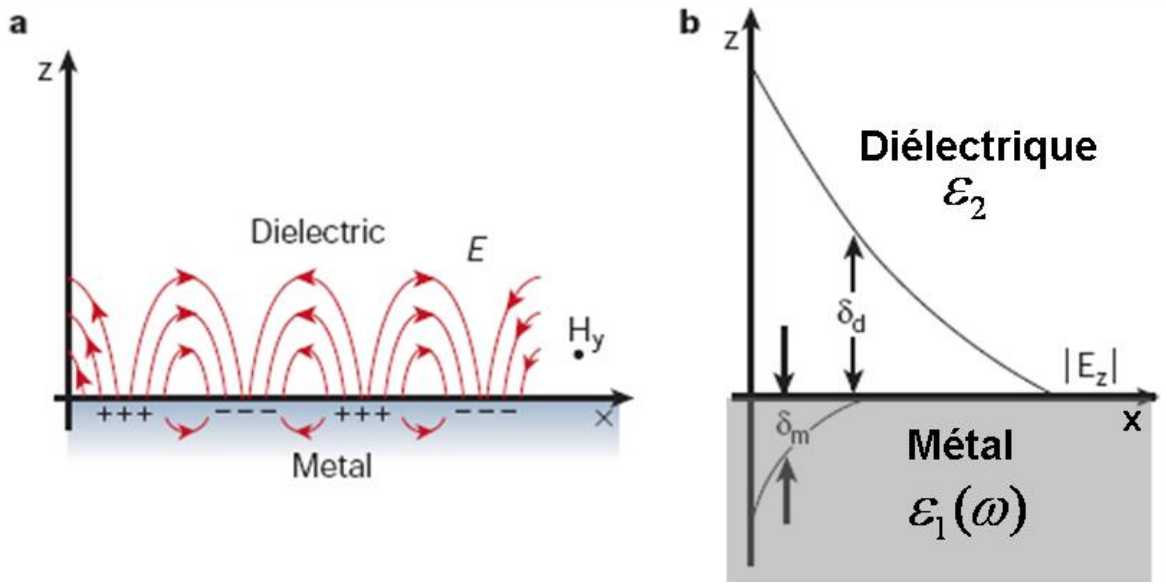


Fig.2.22: (a) Représentation schématique d'un SPP se propageant le long de l'interface entre un métal et un diélectrique. Les + et - représentent respectivement les régions avec une densité d'électrons faible ou élevée. Les SPP sont des modes magnétiques transverses.
(b) Le champ électrique décroit exponentiellement en fonction de la distance à la surface z.
δ_d et δ_m sont respectivement les profondeurs de peau dans le diélectrique et dans le métal
[113].

Les plasmons propagatifs (*Surface Plasmon Polariton* SPP) associés à une surface plane ne peuvent *a priori* pas se coupler directement à la lumière et vont se propager le long de l'interface entre le métal et le diélectrique. Certaines conditions doivent être remplies pour que le couplage puisse avoir lieu, celles-ci sont explicitées dans l'Annexe II.2 [114]. Ainsi, une onde plane de polarisation transverse électrique TE (ce qui correspond à une polarisation *s*, c'est-à-dire normale au plan formé par l'onde incidente et son onde réfléchie), ne pourra pas se coupler aux plasmons de surface et générer une onde évanescente. Le couplage pourra se produire uniquement dans le cas d'une polarisation transverse magnétique (TM) (c'est-à-dire une polarisation *p* qui est contenue dans le plan d'incidence). La relation de dispersion est alors donnée par la relation :

$$k_{SP}(\omega) = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_1(\omega)\varepsilon_2}{\varepsilon_1(\omega)+\varepsilon_2}} \tag{2.25}$$

où k représente la composante de propagation du vecteur d'onde le long de l'interface, ω la pulsation de l'onde scalaire incidente, c la célérité de la lumière, ε_i (avec $i = 1,2$) la permittivité électrique relative du milieu i. En résumé, on peut générer des ondes de surface si $\mathrm{Re}(\varepsilon_1(\omega)) < 0$ et inférieur à $-\varepsilon_2$ (pour que k soit réel) et uniquement pour une polarisation TM du champ (cf. Annexe II.2).

Dans le cas d'une excitation avec une onde plane arrivant sur le métal avec un vecteur d'onde faisant un angle θ par rapport à la normale à l'interface formée entre le diélectrique et le métal, la projection de son vecteur d'onde suivant l'axe de propagation x aura l'expression suivante : $k_{inc//} = n_2 \frac{\omega}{c} \sin\theta$, où n_2 représente l'indice de réfraction du milieu diélectrique 2 ($n_2 = \sqrt{\varepsilon_2} = 1$ pour l'air). On constate donc dans ce cas (Fig.2.23) que les courbes de dispersion (variation de ω en fonction de k) associées aux deux modes (onde plane incidente et plasmon de surface) ne se croisent pas. Le couplage n'est donc pas possible entre ces deux modes.

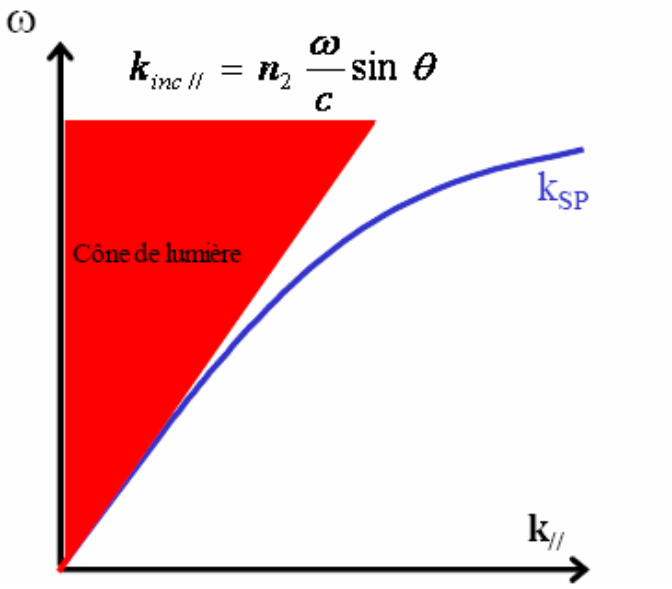


Fig.2.23: Représentation schématique des courbes de dispersion des ondes incidentes sur le métal et des ondes de surface. En rouge, le cône de lumière représente l'ensemble des courbes de dispersion de la lumière incidente sur l'échantillon avec un angle d'incidence θ par rapport à l'axe normal à l'échantillon. La courbe bleue correspond à la courbe de dispersion des plasmons de surface [111].

D'après la figure précédente, la condition nécessaire pour générer une onde évanescente est d'avoir $k_{inc//} > \frac{\omega}{c}$. Nous allons voir succinctement par la suite quelques configurations permettant d'exciter ces plasmons de surface.

De façon à pouvoir réaliser un couplage entre les photons et les plasmons de surface, il y a trois techniques principales. La première consiste à faire passer la lumière incidente à travers un matériau d'indice plus élévé (ex : prisme). Comme on le voit sur la figure 2.24, un accord entre les vecteurs d'onde de la lumière incidente et ceux des plasmons de surface pourra être trouvé et un couplage sera donc possible dans ce cas pour un angle θ_{SP}, angle de résonance plasmon. On distingue deux configurations, la configuration d'Otto, où la lumière excitatrice va provenir du côté du diélectrique et la configuration de Kretschmann où la lumière proviendra du côté du métal. Il est également possible d'utiliser des réseaux périodiques ou des nanostructurations pour réaliser l'accord de vecteur d'onde [22], [111].

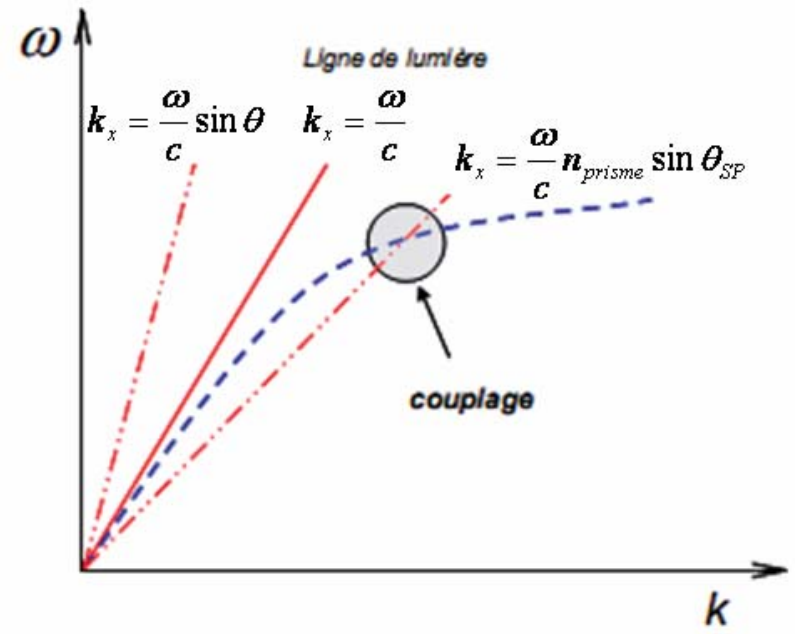


Fig.2.24 : Courbes de dispersion pour un système type verre/métal/air. Il n'y a pas d'intersection dans le diélectrique entre la courbe de dispersion des plasmons de surface et la courbe de dispersion des photons ($k_x = \frac{\omega}{c}\sin\theta$) ce qui rend impossible un couplage. En revanche, à travers le prisme, un couplage est possible entre la lumière incidente et les plasmons de surface pour un angle θ_{SP} spécifique [111].

Nous avons ainsi étudié le couplage des plasmons de surface et de la lumière incidente en utilisant un objectif à grande ouverture numérique et une configuration de Kretschmann (où la lumière provient du côté du métal). Comme nous allons le voir par la suite, ce couplage va induire une amplification du champ électromagnétique local et notamment une amplification de la fluorescence à l'angle plasmon. Le contrôle des interactions entre les fluorophores et les plasmons permet ainsi d'améliorer les techniques d'imagerie.

3.3.2.2 Exaltation de la fluorescence et diminution de la durée de vie de fluorescence à la proximité d'une surface métallique

Comme nous l'avons vu précédemment, les propriétés d'émission d'un fluorophore placé sur un substrat diélectrique transparent à l'interface entre l'eau et le verre étaient modifiées (Fig.2.13, [21]). Ainsi pour un dipôle placé à proximité d'une surface (d < 100 nm), il peut y avoir des couplages de type champ proche. En considérant une surface métallique, une exaltation du signal de fluorescence d'un facteur 10 à 15 sera possible par rapport à un signal obtenu en épifluorescence sur un substrat de verre, par une bonne addition des champs directs et réfléchis avec le champ lointain [115]. Quand la distance entre le fluorophore et l'interface diminue, cela induit une augmentation du nombre de processus de désexcitation lié au fort couplage champ proche et cela va donc également générer une diminution plus significative de la durée de vie de fluorescence pour des petites distances [110]. Il y aura ainsi une forte diminution de la durée de vie des fluorophores distants de 50-100 nm par rapport au métal, qui est plus significative que celle engendrée à l'interface avec un diélectrique (Fig.2.25).

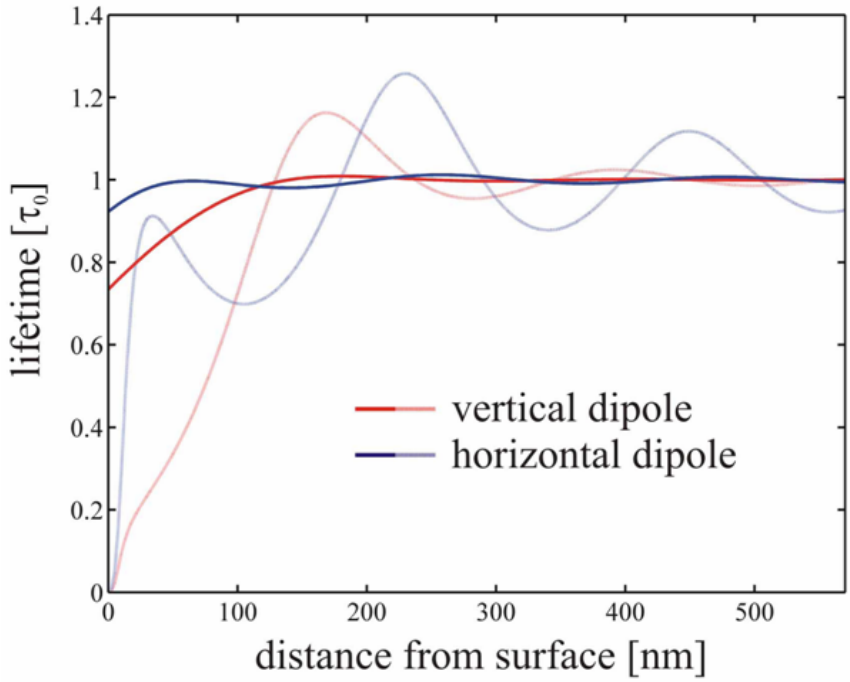


Fig.2.25 : Variations de la durée de vie de fluorescence des fluorophores en fonction de leur distance par rapport au métal et de l'orientation du fluorophore. Les lignes épaisses représentent les variations de la durée de vie de fluorescence de molécules pour une interface eau/verre et les lignes estompées dans le cas où une couche de métal est présente à l'interface [116].

Pour un fluorophore à proximité d'une surface métallique, il est ainsi possible de coupler l'énergie transmise par la molécule en champ proche aux plasmons de surface (avec une configuration de Kretschmann par exemple). La lumière est alors émise unidirectionnellement dans la direction de θ_{SP} [117]. Cette technique appelée SPCE (*Surface Plasmon Cross Emission*) permet ainsi d'exalter la fluorescence et présente de nombreux avantages entre autres, l'émission de fluorescence est directionnelle (ce qui permet une bonne discrimination) et sa distribution angulaire dépend de la longueur d'onde, ce qui est intéressant si on recherche une bonne résolution spectrale. La technique SPCE permet de pallier la perte éventuelle du confinement de l'onde évanescente sous excitation TIRF due à des différences d'indice au sein des échantillons biologiques [23], évitant ainsi une diminution du rapport signal sur bruit du signal de fluorescence (Fig.2.26).

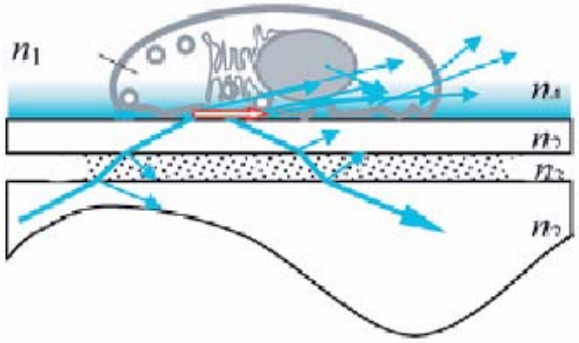


Fig.2.26 : Illustration de la diffusion du champ évanescent dans une cellule. Les faisceaux incident et réfléchi sont schématisés par les flèches bleues externes. Les photons diffusés et réfléchis à l'intérieur de la cellule sont représentés par les flèches bleues internes. La direction de propagation du champ évanescent est schématisée par la flèche rouge [100].

Ces deux techniques ont ainsi été couplées pour former la technique de SPETIRF (*Surface Plasmon Enhanced TIRF*) ou de SPMFM (*Surface Plasmon–Mediated Fluorescence Microscopy*). Cette méthode ne va pas augmenter de façon significative l'efficacité de collection. En revanche, la résolution axiale sera améliorée facilitant l'imagerie d'échantillons biologiques [118]. De plus, étant donné que seuls les fluorophores proches de la surface peuvent se coupler aux plasmons de surface par couplage de champ proche, l'émission des fluorophores plus éloignés sera réfléchie par la surface. Le métal se comporte ainsi comme un filtre à l'émission ce qui permet de s'affranchir de la diffusion provenant des zones plus profondes de l'échantillon. Cela induit au final une exaltation du signal de fluorescence d'un facteur compris entre 2,5 et 5 (Fig.2.27), ce qui facilite l'imagerie de phénomènes biologiques [119].

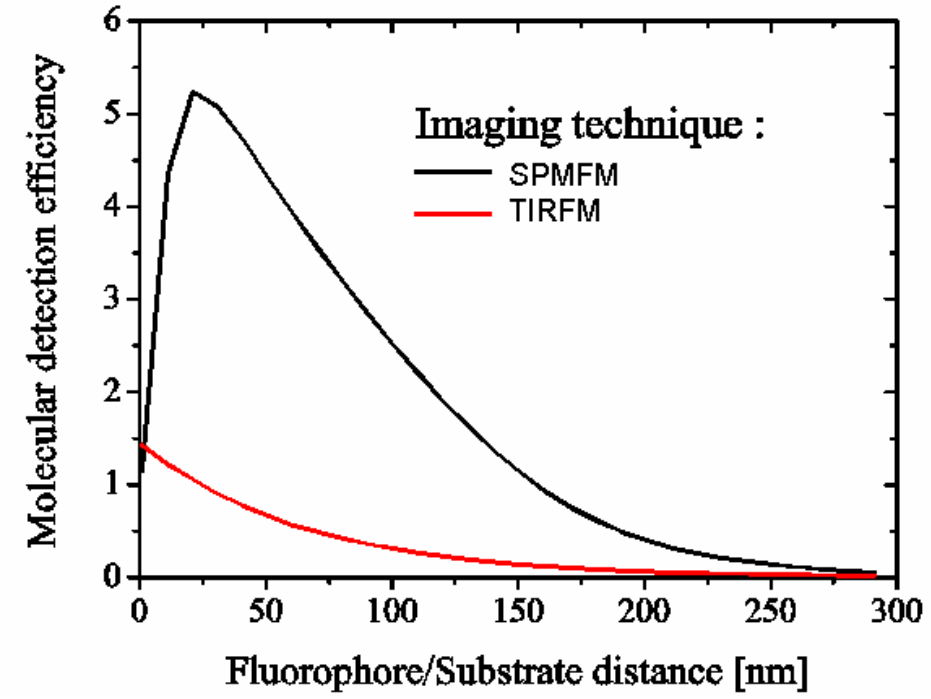


Fig.2.27 : Variations de l'efficacité de détection du signal de fluorescence en fonction de la distance des fluorophores au substrat. Le substrat est du verre dans le cas de l'imagerie TIRFM (en rouge) ou bien une couche de 40 nm d'argent (en noir) [111].

Sur la figure 2.27, on constate que dans le cas de l'imagerie en SPMFM, on aura une bonne collection du signal provenant des fluorophores situés entre 20 et 120 nm par rapport au métal. Le maximum d'exaltation de la fluorescence est environ d'un facteur 5 et concerne les fluorophores situés à une distance de 30 nm par rapport au métal, ce qui comparable avec des fluorophores localisés au niveau de la membrane des cellules. Cependant, il y aura un *quenching* du signal de fluorescence des molécules situées à moins de 10 nm de la surface métallique et on n'observera donc pas l'exaltation de la fluorescence pour de telles distances, il y aura uniquement une diminution du bruit de fond.

3.3.2.3 Dispositif SPETIRF

Pour suivre les modifications des processus de fluorescence de fluorophores placés à proximité d'une surface métallique, nous avons choisi d'utiliser comme métal l'argent car il présente une bonne efficacité de couplage [111]. Le dispositif SPETIRF repose sur le dispositif TIRFLIM sur lequel nous avons mis en place un objectif 60x dont l'ouverture numérique est égale à 1,49 (objectif *Nikon*) pour pouvoir atteindre l'angle de résonance plasmon pour des longueurs d'onde de l'ordre de 500 nm. L'excitation et la collection de la fluorescence se font toujours à travers l'objectif.

Pour pouvoir exciter les plasmons de surface et remplir la condition d'accord de vecteur d'onde, nous avons choisi une configuration de Kretschmann, où la lumière excitatrice va provenir du côté du métal, en traversant tout d'abord la lamelle dont l'indice (n_1 = 1,5) est supérieur à celui du milieu biologique (n_2 = 1,38 environ). L'échantillon est ainsi excité par la face arrière du métal. Dans cette configuration, on peut exciter les plasmons de surface pour l'angle θ_{SP} tel que $k_{SP} = \frac{\omega}{c} n_1 \sin\theta_{SP}$. Pour les angles d'incidence plus faible que l'angle plasmon, le film métallique va réfléchir quasiment toute la lumière incidente alors qu'à l'angle de résonance plasmon l'intensité du champ évanescent sera augmentée. Etant donné que nous disposons d'un objectif dont l'ouverture numérique est égale à 1,49, on va pouvoir accéder à des angles allant jusqu'à 83° environ (soit $\arcsin\left(\frac{ON}{n_1}\right)$) alors qu'avec un objectif dont l'ouverture numérique vaut 1,45, l'angle maximal que nous pourrons atteindre n'est que de 75°. D'après la figure 2.28, représentant la variation de l'angle de résonance du plasmon θ_{SP} en fonction de la longueur d'onde d'excitation, nous pourrons exciter les plasmons avec l'ouverture numérique de l'objectif dont nous disposons, pour des longueurs d'onde supérieures à 500 nm uniquement. L'ouverture numérique de l'objectif limite donc le choix des marqueurs que nous pourrons exciter en SPETIRF.

L'ensemble des fluorophores utilisés remplissait ces conditions d'excitation et de détection. Expérimentalement cet angle de résonance plasmon a été repéré en déplaçant la platine motorisée latéralement et en recherchant l'augmentation significative du signal de fluorescence. Celle-ci a lieu après l'angle critique (qui se situe autour de 62°, dans une configuration verre/milieu aqueux, d'indice 1,33). A l'angle critique, on observe déjà une légère augmentation de la fluorescence avant de passer en régime TIRF puis SPETIRF à l'angle de résonance plasmon. Pour ces expériences le laser n'était pas polarisé ou alors était polarisé suivant *p* (cf. chapitre IV pour la description du dispositif) pour pouvoir exciter les plasmons de surface [23].

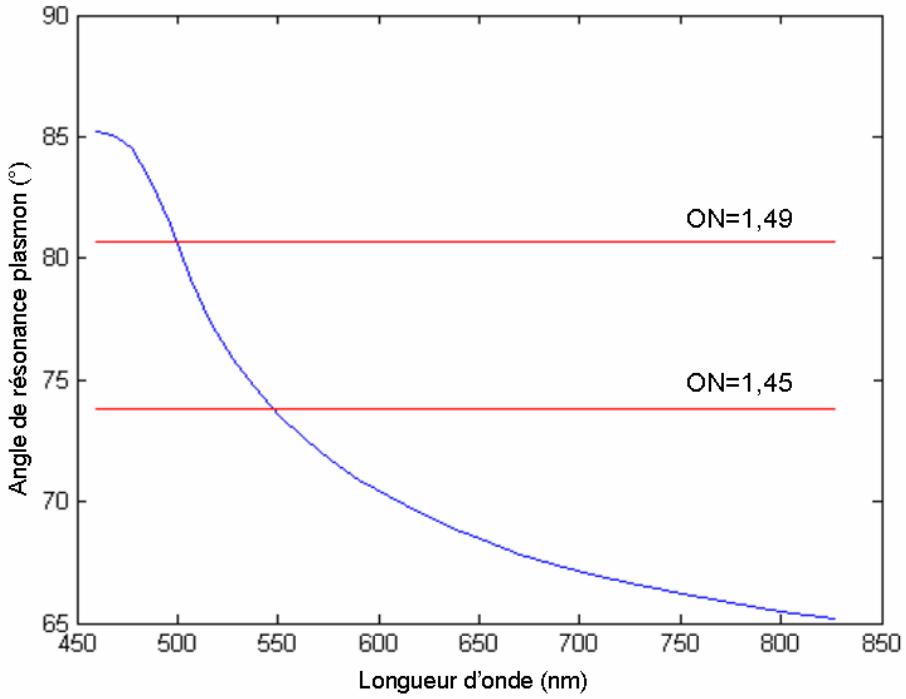


Fig.2.28: Variations de l'angle de résonance plasmon en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Les angles maximums accessibles avec les ouvertures numériques de nos objectifs sont représentés [111].

3.3.2.4 Evaluation de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente sous excitation SPETIRF

Il a déjà été montré que la présence d'une surface d'or induit des changements de la durée de vie de fluorescence des molécules en fonction de leur distance au métal. L'équipe de D. Richards a ainsi retrouvé le déclin mono-exponentiel de fluorophores dans des microsphères, placées sur une surface d'or, en utilisant un microscope confocal [120].

Dans le but de trouver un système nous permettant d'effectuer une mesure de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, nous avons cherché à observer des diminutions de la durée de vie de fluorescence lors du passage d'une excitation en épifluorescence à une configuration en TIRF puis en SPETIRF. Pour cela, nous avons observé des billes *FocalCheck* (10 à 15 µm) ayant un marquage uniquement sur leur surface. Sur ces billes, nous voulions mettre en évidence des différences de durée de vie de fluorescence du point de contact entre la bille et le métal pour les différentes configurations d'excitation. Les échantillons utilisés sont des lamelles de verre dont une partie est recouverte de plusieurs dépôts métalliques (Fig.2.29). Ces dépôts sont composés d'une fine épaisseur de chrome pour favoriser l'adhésion de l'argent (2 nm), d'une couche d'argent (50 nm environ) et d'une fine couche d'or (2 nm) pour protéger la couche d'argent. Ces échantillons nous permettent ainsi de faire des mesures de durée de vie de fluorescence sur le verre et sur le métal.

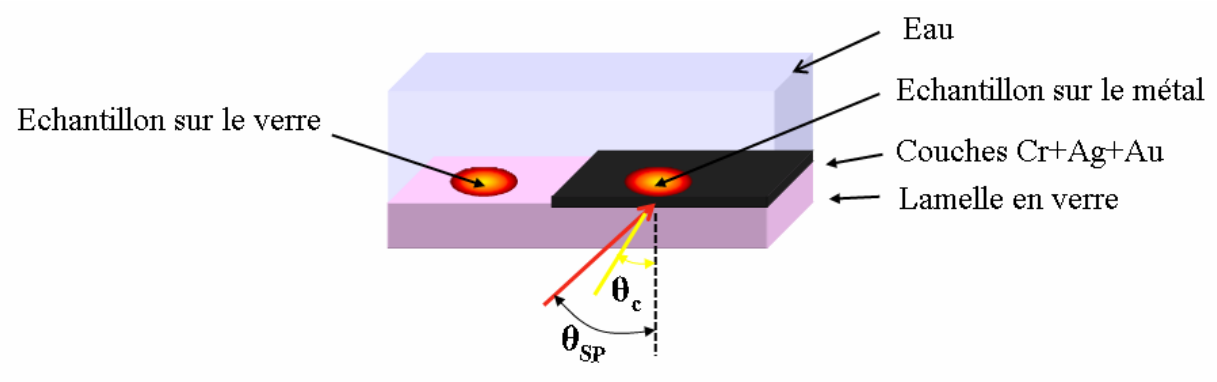


Fig.2.29 : Schéma simplifié des surfaces plasmoniques utililisées.

Nous avons choisi comme échantillon des billes de 15 µm en polystyrène n'ayant un marquage que sur leur surface (*FocalCheck microspheres*, 15 µm, *fluorescent blue orange ring stains*, *Invitrogen*). Ces billes possèdent un double marquage en surface dans le bleu (exc : 365 nm/ em : 430 nm) et dans l'orange (exc: 560 nm/ em : 580 nm). Elles sont communément utilisées pour effectuer des calibrations des lasers confocaux notamment pour l'alignement et la séparation spectrale de multiples voies laser et voies de détection. Nous avons donc utilisé ces billes en suspension dans l'eau puis nous les avons déposées sur notre échantillon métallique. Celui-ci avait été préalablement placé dans un support de lamelle (*Attofluor*, *Invitrogen*), qui facilite l'accès à l'échantillon et permet de recouvrir l'échantillon de la solution d'intérêt, avec la face métallique orientée vers le dessus pour que l'excitation se fasse en configuration de Kretschmann. Pour l'excitation et la détection, nous avons utilisé le cube TXRED.

Après avoir effectué la mise au point sur une bille, nous avons déplacé la platine de translation pour passer d'une excitation en épifluorescence à une excitation au-delà de l'angle critique puis en SPETIRF. Nous avons repéré les positions de la platine correspondant à chaque type d'excitation, en suivant l'augmentation de l'intensité de fluorescence sur la caméra EMCCD de la voie de détection en intensité (Fig.2.5). Nous avons alors observé une augmentation de l'intensité de fluorescence d'un facteur 5 entre l'excitation en TIRF par rapport à l'excitation en SPETIRF (Fig.2.30), ce qui est en accord avec les études précédentes [121].

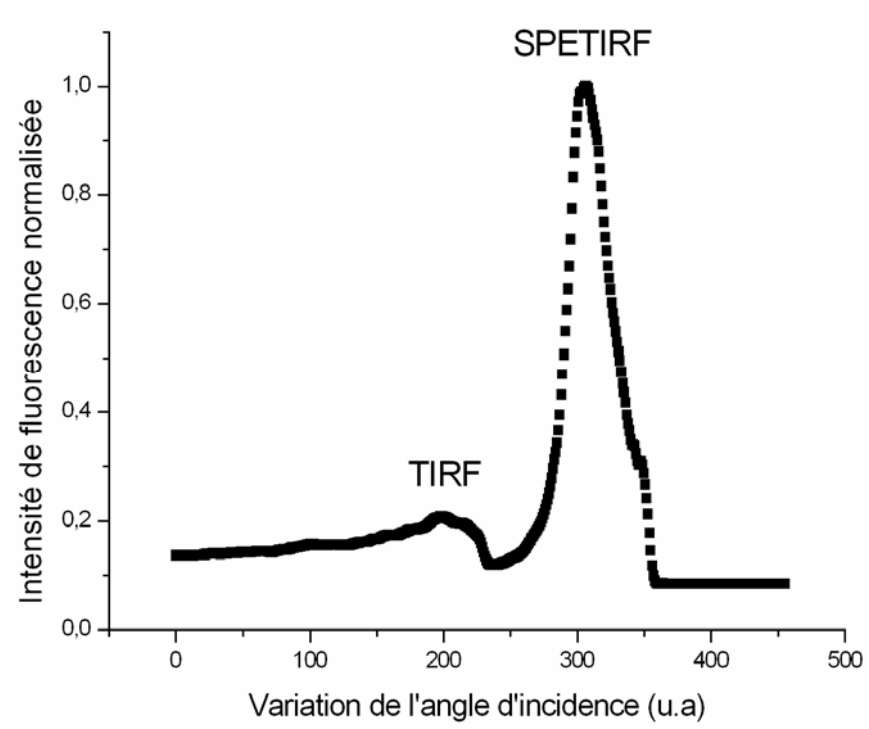


Fig.2.30 : Variations de l'intensité de fluorescence de billes marquées en surface déposées sur un support métallique, lors de l'augmentation de l'angle d'incidence sur l'échantillon faisant passer d'une excitation en épifluorescence à une excitation en TIRF puis en SPETIRF.

Etant donné la variation précédente de l'intensité de fluorescence en fonction de l'angle d'incidence sur l'échantillon, nous nous sommes ensuite positionnés aux angles correspondant à une excitation en TIRF et en SPETIRF et nous avons effectué des mesures de durée de vie de fluorescence pour chacune des trois conditions d'excitation en utilisant la voie de détection FLIM. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord placés à l'angle de résonance du plasmon pour effectuer la mise au point et trouver le bon plan de focalisation. Il correspond au point de contact de la bille avec la surface métallique et à la position où la diffusion est la moins importante. En effet, l'observation des billes est entachée d'une diffusion assez conséquente liée à leur composition en polystyrène qui a un indice plus élevé que le milieu aqueux environnant (Fig.2.31.A). Nous avons observé un halo lumineux dont le centre est noir, en raison du *quenching* de la fluorescence par le métal au niveau du point de contact. Ensuite nous avons déplacé la platine de translation pour passer en excitation TIRF puis en épifluorescence sans modifier la mise au point. Pour l'acquisition pour chacune des trois positions d'excitation, nous avons utilisé le mode *Comb Low* avec 19 portes temporelles de 800 ps de largeur, pour bien échantillonner le déclin de fluorescence. Dans ces conditions, nous avons mesuré la durée de vie moyenne de fluorescence du point de contact de plusieurs billes (Tab.2.2. & Fig.2.31.B).

Excitation en épifluorescence			**Excitation en TIRF**			**Excitation en SPETIRF**		
Ddvm (ps)	SEM (ps)	N	Ddvm (ps)	SEM (ps)	N	Ddvm (ps)	SEM (ps)	N
4340	15	11	4492	17	11	3961	15	11

Tab.2.2 : Durée de vie moyenne (Ddvm) du point de contact de la bille avec la surface métallique et erreur à la moyenne associée (sem) sur un nombre N d'échantillons, pour les trois conditions d'illumination (épifluorescence, TIRF et SPETIRF).

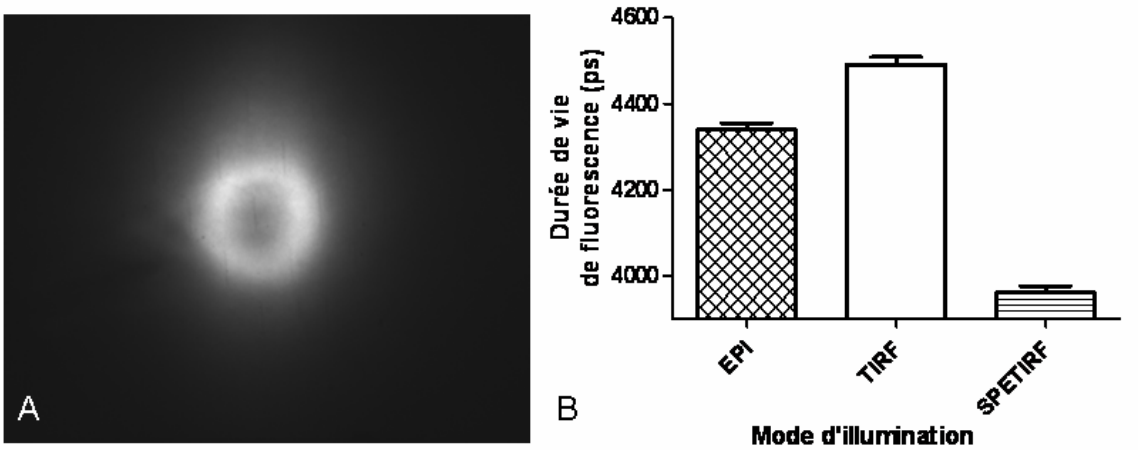


Fig.2.31: (A) Exemple d'une image en intensité de fluorescence du point de contact d'une bille excitée en SPETIRF. (B) Variations de la durée de vie de fluorescence du point de contact de billes placées sur une surface métallique, pour différentes conditions d'illumination.

Nous avons constaté que les différences de durée de vie entre les trois conditions d'illumination sont significatives (Fig.2.31.B). En effet, une analyse statistique t-test non apparié et sans *a priori* permet de dissocier les populations en comparant deux à deux les trois conditions d'excitation ($p < 0{,}0001$, ***). De plus, les durées de vie de fluorescence mesurées en excitation en épifluorescence (Fig.2.32.A) et sous excitation TIRF (Fig.2.32.B), sont supérieures à celles obtenues sous excitation SPETIRF (Fig.2.32.C). Nous avons donc observé une diminution de la durée de vie de fluorescence sous excitation SPETIRF.

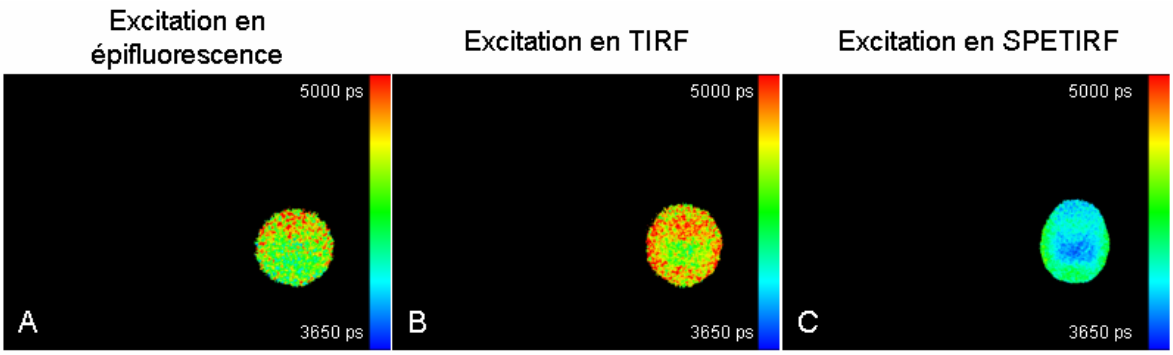


Fig.2.32: Exemples de mesure de durée de vie de fluorescence du point de contact de billes placées sur une surface métallique pour différentes conditions d'illumination, en épifluorescence (A), en TIRF (B), en SPETIRF (C).

Sous excitation SPETIRF, nous avons mesuré localement des différences de durées de vie en fonction de la distance au centre de la bille, comme cela avait été mis en évidence précédemment [112], [120]. On peut relier ces différences de durée de vie à la distance des fluorophores par rapport à l'interface métallique à l'aide du modèle précédent (Fig.2.25). Les mesures de durée de vie de fluorescence effectuées sous excitation SPETIRF correspondraient à des fluorophores situés dans les 120 premiers nanomètres par rapport à la surface métallique. Sous excitation TIRF, nous avons obtenu une durée de vie moyenne qui est supérieure à celle obtenue en épifluorescence (Tab.2.2). D'après la figure 2.25, cette augmentation serait liée aux oscillations de la durée de vie de fluorescence des fluorophores situés à une distance comprise entre 120 et 220 nm par rapport à au métal. Un programme sous *Matlab* est en cours de développement dans notre équipe pour déterminer localement, pour chaque pixel de l'image, la distance des fluorophores par rapport à l'interface à l'aide des mesures de durée de vie de fluorescence.

3.4 Imagerie cellulaire en SPETIRF sur cellules vivantes et fixées

Le but de ces expériences était d'observer localement des différences de durée de vie des fluorophores en cellules pour pouvoir les relier à différentes distances à la surface métallique. Ces informations ont un intérêt biologique par exemple dans le suivi de l'internalisation de protéines ou d'interaction de type récepteur/ligand. Ce type d'expériences a déjà été mené par l'équipe de D. Richards avec un microscope confocal à partir de cellules fixées sur un film d'or et exprimant CXCR4, récepteur impliqué dans le développement embryonnaire ainsi que dans différents cancers. Ils ont ainsi mis en évidence des différences de durée de vie de fluorescence de CXCR4-eGFP, en fonction de son association avec son ligand CXCL12 par endocytose [120]. Ces observations ont été faites avec des échantillons fixés, observés en épifluorescence, en bénéficiant uniquement du couplage avec le plasmon à l'émission. Nous avons cherché à réaliser le même type d'expériences mais en excitant les plasmons de surface en configuration de Kretschmann, avec un couplage à l'excitation et à l'émission.

De la même façon, sur notre dispositif SPETIRF, nous avons voulu observer des différences de durée de vie de fluorescence de marqueurs en cellules observées en transmission à l'angle de résonance du plasmon et déposées sur des surfaces métalliques,. A cet angle, nous aurons une bonne efficacité de collection et nous souhaitons retrouver les variations de la durée de vie des fluorophores en accord avec la théorie (Fig.2.25).

Des expériences ont ainsi été faites sur des cellules modèles à savoir des cellules HEK-293 (cellules humaines embryonnaires de rein) et en cellules COS-7 (cellules dérivées de la lignée cellulaire rénale du singe vert africain) avec différents marquages pour trouver le modèle le plus adapté. Les surfaces métalliques utilisées étaient semblables à celles présentées précédemment (Fig.2.29). Les cellules, portées à confluence, étaient tout d'abord décollées puis resuspendues dans du milieu de culture (DMEM complet, cf. Annexe III.1). L'échantillon était recouvert de ce milieu riche en cellules en suspension et placé dans l'incubateur (37°C, 5% CO_2), pour que les cellules puissent adhérer sur l'échantillon pendant 4 h. Si ce temps d'incubation était dépassé, les cellules et leur milieu de culture détérioraient le dépôt métallique qui se désagrégeait. Les premiers échantillons comportaient au départ uniquement la couche d'argent mais l'adhésion des cellules sur ces surfaces n'était pas optimale. Nos collègues de l'Institut Langevin ont donc rajouté une fine couche d'or, qui est un métal biocompatible. Cette fine couche d'or ne décalait pas l'angle de résonance du plasmon associé à la couche d'argent qui était accessible avec l'ouverture numérique de notre objectif.

Nous avons tout d'abord essayé de mettre en évidence des différences de durée de vie de fluorescence en cellules vivantes mais cela introduisait des artefacts dans les mesures, étant donné que les cellules adhéraient mal à la surface. Par conséquent, nous ne savions pas si les différences de durée de vie de fluorescence observées étaient liées à des distances différentes des fluorophores par rapport au métal ou bien au décollement de la cellule lors de l'acquisition. Nous avons donc préféré par la suite travailler avec des échantillons fixés au paraformaldéhyde 4% (PFA) pour limiter les incertitudes de mesure (cf. Annexe II.3). Concernant les cellules utilisées, nous avons commencé par travailler sur un modèle cellulaire couramment utilisé au laboratoire, les cellules HEK-293. Cependant ces cellules se sont révélées insuffisamment adhérentes sur les échantillons métalliques, nous avons donc testé un autre modèle cellulaire, les COS-7 qui ont une adhésion plus forte que les HEK-293.

Pour le choix du marquage, nous voulions un marqueur de la membrane plasmique étant donné que d'après la figure 2.27, l'exaltation de la fluorescence sera maximale pour des fluorophores situés à une distance d'environ 30 nm par rapport au métal, ce qui est comparable à une localisation dans la membrane des cellules. Il fallait de plus que ce marqueur s'excite autour de 500 nm pour pouvoir exciter le plasmon avec notre dispositif. Nous avons testé différents types de marquage (di-4-ANEPPDHQ, marqueur des domaines lipidiques de la membrane plasmique des cellules ; Rhodamine 123, marqueur des mitochondries ; DiL), mais le signal de fluorescence obtenu avec ces marquages était peu spécifique donnant des images avec beaucoup de diffusion et de faible intensité, engendrant

un très mauvais rapport signal sur bruit. Nous avons ensuite utilisé un autre marqueur des membranes (*CellMask Orange plasma membrane stain*, *Invitrogen*), (Fig.2.33).

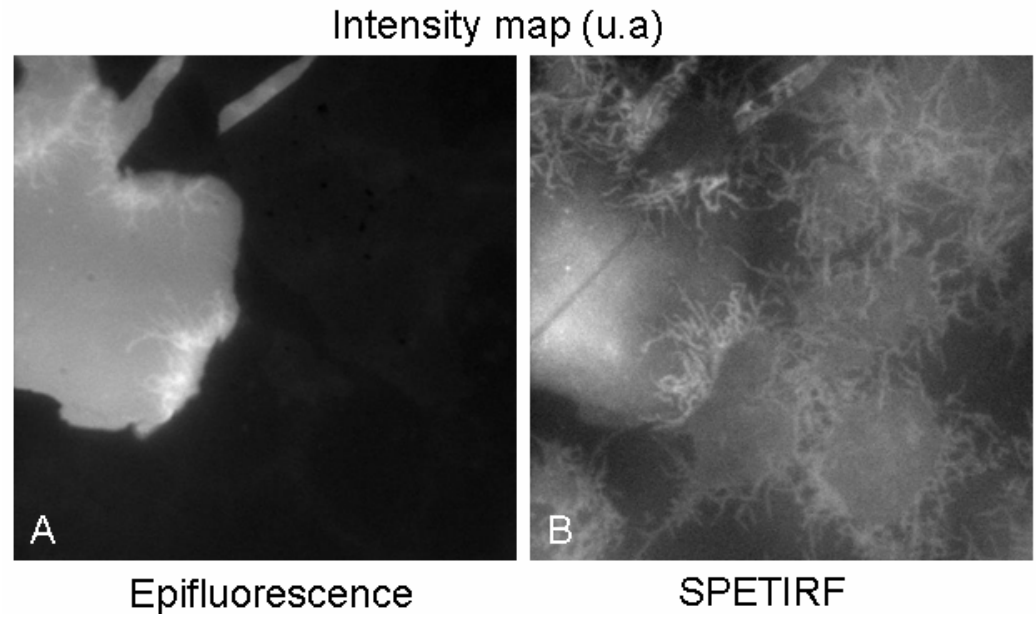


Fig.2.33 : Images en intensité de fluorescence obtenues sur la caméra EMCCD de cellules HEK-293 marquées avec « CellMask Orange plasma membrane stain » déposées sur un échantillon métallique mais avec une partie en verre (quart en haut à gauche), pour une excitation en épifluorescence (A) ou en SPETIRF (B).

Que ce soit pour les mesures effectuées sur les billes (Fig.2.30) ou sur les cellules marquées (Fig.2.34), nous avons observé la même variation de l'intensité de fluorescence lors du passage d'une excitation en épifluorescence à une excitation SPETIRF sur le métal. Sur cet exemple (Fig.2.34), nous avons une exaltation de l'intensité de fluorescence d'un facteur 1,2 en SPETIRF par rapport à l'épifluorescence sur le métal.

De plus, d'après les images en intensité obtenues pour les deux conditions d'excitation en épifluorescence (Fig.2.33.A) et en SPETIRF (Fig.2.33.B), nous constatons que pour une excitation en SPETIRF le métal devient transparent à l'émission. En effet, pour une excitation en épifluorescence, la transmission du verre est meilleure que celle du métal, qui apparaît sombre alors que le verre est brillant (Fig.2.33.A). En épifluorescence, nous ne distinguons pas les cellules qui ont adhérées sur le métal, en revanche dès le passage sous excitation SPETIRF, nous pouvons clairement les observer. Le métal se comporte bien comme un filtre à l'émission en excitation SPETIRF, en ne laissant passer la fluorescence que provenant des fluorophores placés dans la première centaine de nanomètres et en réfléchissant la fluorescence provenant des zones plus profondes de l'échantillon. Cependant, on n'observe pas une exaltation du signal de fluorescence par rapport aux cellules qui sont sur le verre. Cela peut s'expliquer par un *quenching* du signal des fluorophores qui doivent être situés à une dizaine de nanomètres du métal (Fig.2.27). Après avoir repéré la position de l'angle de résonance du plasmon, nous avons effectué des mesures de durée de vie de fluorescence sur ces mêmes types d'échantillons pour une excitation en SPETIRF.

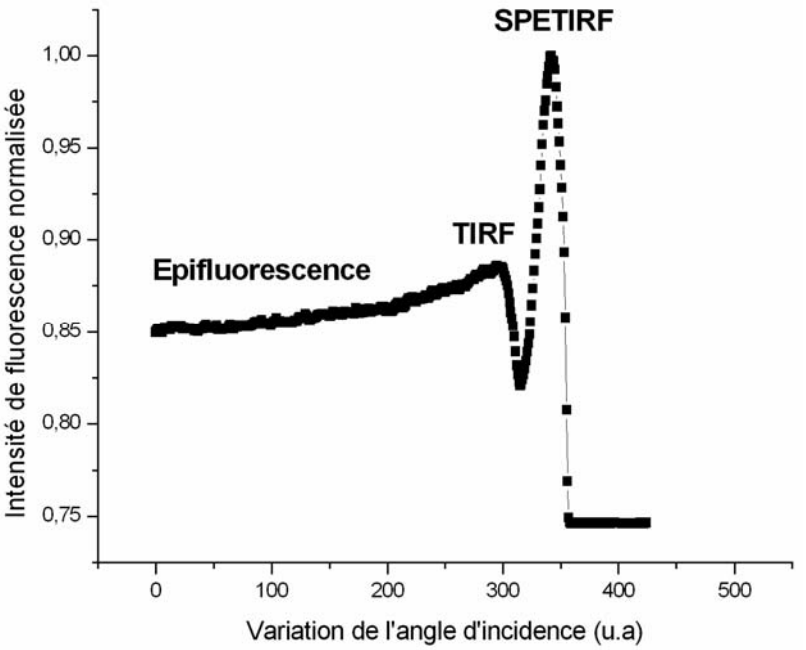


Fig.2.34: Variations de l'intensité de fluorescence normalisée de cellules HEK-293 marquées avec « CellMask Orange plasma membrane stain » et déposées sur le métal, en fonction de l'angle d'incidence du faisceau excitateur.

Sur les images en intensité pour une excitation en épifluorescence et pour une excitation en SPETIRF (Fig.2.35.A&B), comme pour les images précédentes en intensité (Fig.2.33), nous distinguons à peine la cellule sur la partie métallique dans le cas d'une excitation en épifluorescence alors qu'en SPETIRF, le métal devient quasiment transparent permettant l'observation mais comme précédemment, on n'observe pas d'exaltation du signal de fluorescence en raison de la trop grande proximité des fluorophores par rapport au métal. Par ailleurs sur la carte de durée de vie de fluorescence en SPETIRF (Fig.2.35.C), nous observons des différences de durée de vie de fluorescence entre les parties de la cellule qui sont sur le verre (au niveau des rayures) et les parties qui sont sur le métal. En effet, nous avons constaté une diminution des durées de vie de fluorescence sur la partie métallique (qui sont de l'ordre de 500 ps) alors que sur le verre, nous avons mesuré des durées de vie de fluorescence autour de 700-800 ps. Cela est en accord avec la théorie développée précédemment, la présence du métal induit des phénomènes de couplage qui diminuent la durée de vie de fluorescence des molécules à sa proximité. Nous avons ainsi mis en évidence des différences significatives des durées de vie de fluorescence mesurées sur le métal et sur le verre.

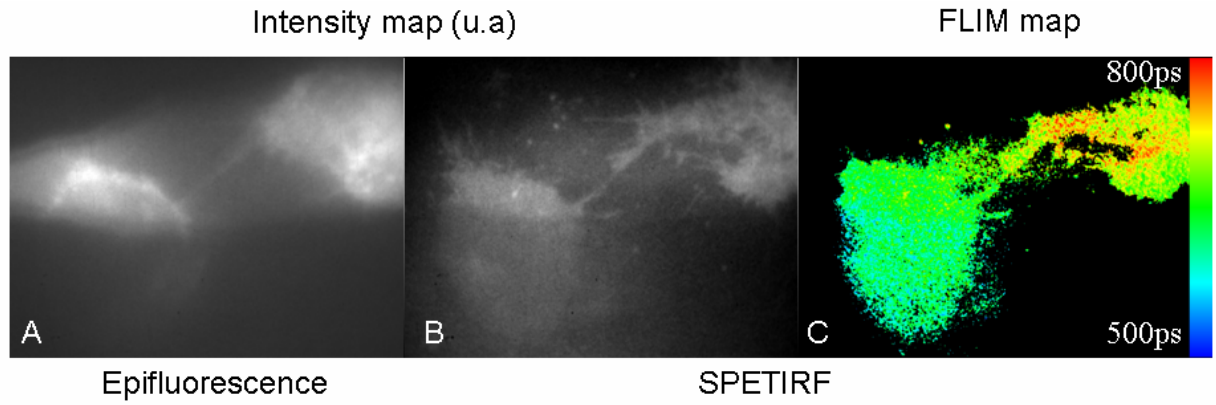


Fig.2.35 : Cellules HEK-293 marquées avec CellMask orange plasma membrane stain déposées sur une lamelle métallisée présentant une rayure. Images en intensité pour une excitation en épifluorescence (A) et pour une excitation en SPETIRF (B). Image en durée de vie de fluorescence pour une excitation en SPETIRF (C).

Cependant sur le métal, nous n'avons pas pu extraire des différences de durée de vie de fluorescence susceptibles d'être reliées à différentes distances des fluorophores par rapport à la surface métallique. Nous avons donc changé de modèle cellulaire d'étude et avons choisi les cellules COS-7. Ces cellules ont été exposées à la toxine cholérique marquée à l'Alexa 555 (*Invitrogen*). Nous avons constaté que la toxine cholérique marque bien les membranes et permet de différencier une excitation en épifluorescence d'une excitation en SPETIRF (Fig.2.36). Du point de vue des cartes de durée de vie de fluorescence, pour chacune des conditions d'excitation, nous avons mesuré des durées de vie de fluorescence très homogènes. Par exemple pour la cellule présentée sur la figure 2.36, en épifluorescence, nous avons mesuré une durée de vie de fluorescence moyenne $ddvm_{epi} = 920 \pm 76$ ps et pour une excitation en SPETIRF $ddvm_{SPETIRF} = 870 \pm 30$ ps. En particulier dans le cas d'une excitation en SPETIRF, les écarts-types sont très faibles. Nous n'avons donc pas pu avec ce modèle détecter des différences de durée de vie de fluorescence suffisamment significatives pour les relier à différentes distances au métal. On remarque par ailleurs que les durées de vie de fluorescence mesurées sont relativement courtes avec ce marquage rendant plus complexe la mise en évidence d'une diminution significative de la durée de vie de fluorescence. Etant donné ces résultats, les cellules COS-7 ne constituent pas non plus un bon modèle pour cette étude. En effet, elles n'ont pas un relief suffisant et les fluorophores se retrouvent tous à la même distance par rapport au métal, les mesures de durée de vie de fluorescence en SPETIRF présentant des écarts-types très faibles pour les différents marqueurs que nous avons testés.

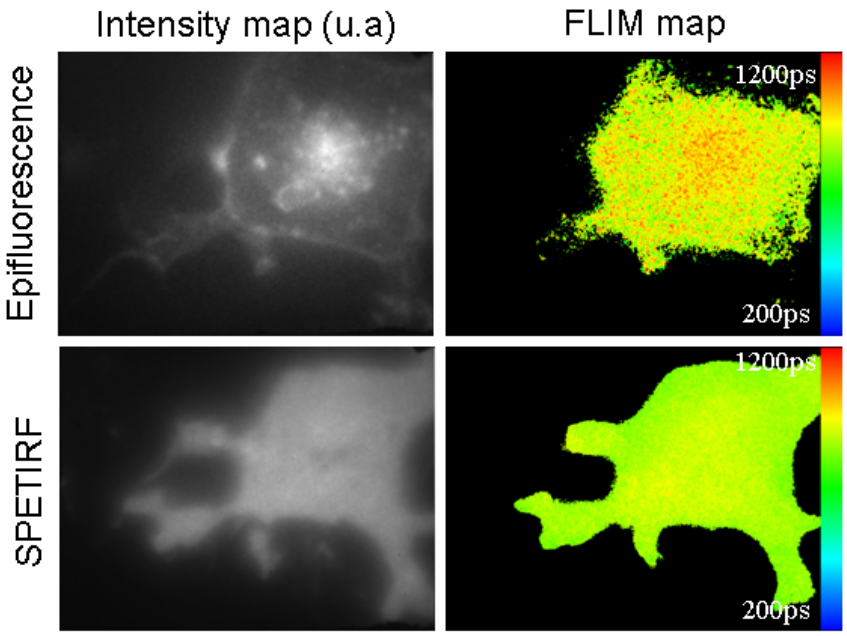


Fig.2.36: Cartes en intensité et en durée de vie de fluorescence de cellules COS-7 mises en contact avec la toxine cholérique marquée à l'Alexa 555 et adhérées sur des échantillons métalliques en excitation en épifluorescence (en haut) et en SPETIRF (en bas).

Les expériences réalisées nous ont permis de nous rendre compte que nous étions limités à la fois par le marquage et par le type cellulaire utilisé. En effet, les marquages membranaires sur les lignées HEK-293 ou COS-7 marquent les fluorophores situés à une dizaine de nanomètre du métal, ce qui induit un *quenching* de leur signal de fluorescence. Des expériences sont actuellement en cours pour trouver le modèle cellulaire et le marquage les plus adaptés pour satisfaire au mieux les conditions suivantes :

- bonne adhésion des cellules sur les échantillons métalliques.
- marquage fluorescent dans le rouge avec un bon rapport signal sur bruit et compatible avec la fixation au PFA. Ce marquage doit être à la fois membranaire pour être observable en SPETIRF mais aussi intracellulaire pour qu'il existe des distributions des distances des fluorophores par rapport à l'interface métallique.

- durée de vie de fluorescence suffisamment longue (de l'ordre de quelques nanosecondes) pour pouvoir mettre en évidence des diminutions significatives de la durée de vie de fluorescence avec la proximité au métal.

Des échantillons vont être prochainement testés en utilisant des cellules HEK-293 exprimant des recepteurs cannabinoïdes (CB1R) marquées à la mCherry ou alors l'APP (protéine d'intérêt dont les fonctions seront détaillées dans le chapitre suivant) marquée à la mCherry. Des expériences pourraient également être réalisées sur des dictyosteliums, organisme eucaryote qui pourrait présenter différentes distances de sa membrane par rapport à l'interface. L'utilisation de modèles de membrane (GUV *Giant Unilamellar Vesicles*) avec une orientation contrôlée des fluorophores pour un couplage optimum avec les plasmons serait une autre approche, afin d'avoir une compréhension plus complète de ces interactions.

4 Bilan des développements instrumentaux

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté le microscope TIRFLIM mis en place au laboratoire. Celui-ci permet ainsi d'exciter en plein champ des échantillons avec une résolution axiale sub-longueur d'onde grâce au TIRF. Couplé à la mesure de durée de vie de fluorescence, un suivi dynamique des interactions moléculaires ayant lieu au niveau de la membrane plasmique des cellules peut être effectué. Les différents paramètres d'excitation et d'acquisition sont ajustables : accordabilité de la longueur d'onde d'excitation, choix du mode d'acquisition en fonction de la durée de vie de fluorescence à mesurer, de la précision et de la vitesse d'acquisition souhaitées. Les performances de notre système ont été évaluées, en termes de résolution latérale et axiale, de fréquence spatiale, pour connaître le niveau de détail qui est potentiellement imageable. L'évaluation précise de la résolution axiale en excitation TIRF, c'est-à-dire la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, nécessite quelques expériences et analyses complémentaires. Cela étant, le dispositif a été adapté pour les problématiques biologiques, afin de réaliser des expériences dans les conditions physiologiques des cellules tout en assurant une bonne reproductibilité des mesures.

Comme nous l'avons abordé au cours de ce chapitre, il demeure toujours des limitations à ce système telles que la diffusion résiduelle liée au mauvais confinement de l'onde évanescente. Une bonne façon d'y remédier est de coupler des surfaces plasmoniques à ce type de dispositif pour améliorer le rapport signal sur bruit du système en exaltant le signal de fluorescence et en filtrant le signal provenant des fluorophores éloignés du métal. Les surfaces plasmoniques peuvent également être utilisées pour évaluer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. En effet, la présence du métal va modifier les processus d'émission de fluorescence aboutissant à une diminution de la durée de vie de fluorescence proportionnelle à la distance à l'interface. Nous avons réussi à mettre en évidence ces diminutions dans des billes fluorescentes mais le modèle biologique permettant d'illustrer de telles variations reste à déterminer.

Les chapitres suivant vont s'intéresser aux différentes problématiques biologiques qui ont été étudiées au cours de cette thèse. Les caractéristiques de ce microscope TIRFLIM font de ce dispositif un outil particulièrement bien adapté pour effectuer des suivis dynamiques d'interactions au niveau de la membrane plasmique des cellules. Le suivi de l'hétérodimérisation de deux protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer va être développé dans le chapitre suivant.

Chapitre III : Etude de l'hétérodimérisation de deux protéines impliquées dans la Maladie d'Alzheimer

L'étude présentée dans ce chapitre a été menée en collaboration avec Catherine Marquer et Jack-Christophe Cossec de l'équipe de Marie-Claude Potier et Charles Duyckaerts du Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (CRICM) et Géraldine Liot et Diana Zala, membres de l'équipe de Frédéric Saudou au sein de l'unité Signalisation, Neurobiologie et Cancer de l'Institut Curie d'Orsay. Elle porte sur le suivi de l'interaction entre deux protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer.

1 Problématique biologique : la maladie d'Alzheimer

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 Quelques chiffres

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. Elle a été décrite pour la première fois en 1906 par Alois Alzheimer, psychiatre et neurologue allemand. On estime que la prévalence de cette maladie est de 0,5% avant 65 ans puis de 2 à 4% entre 65 et 80 ans, pour atteindre environ 15% à 80 ans. Au niveau mondial, le nombre de cas de maladie d'Alzheimer était évalué à 35,6 millions en 2010. Ce chiffre atteindrait 65,7 millions en 2030 et 115,4 millions en 2050 [122]. Les deux tiers des patients concernés vivraient dans des pays en voie de développement dans lesquels la croissance de la maladie serait la plus importante. Il y aurait aujourd'hui en France plus de 860 000 cas de démence de type Alzheimer [123]. Le nombre de cas devrait doubler tous les 20 ans [124] et on estime ainsi qu'en 2020 le nombre de malades en France sera de 2 millions. Comprendre les mécanismes de cette maladie pour pouvoir la soigner est donc un enjeu médical et scientifique mais également social et économique majeur. La mise en place depuis le 1er février 2008 en France d'un plan national sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées rend bien compte de l'enjeu économique de santé publique qu'est devenue la maladie d'Alzheimer.

1.1.2 Les différentes formes de maladie d'Alzheimer et leur étiologie

Il existe deux formes de maladie d'Alzheimer: la forme Familiale Autosomique Dominante (FAD) et la forme sporadique (99% des cas).

Les FAD sont des formes familiales agressives et à début précoce de la maladie. Elles ont des origines génétiques, liées à des mutations des gènes de la protéine précurseur de l'amyloïde (*Amyloïd Precursor Protein* APP) et des présénilines 1 et 2, protéines impliquées dans différentes voies de signalisation et notamment dans le clivage des protéines Notch et APP [125].

Les formes sporadiques de la maladie représentent 99% des cas et ont des origines multifactorielles. L'âge est un facteur important et le risque de développer cette maladie double par tranche d'âge de 5 ans après 65 ans. Il y a également une forte association entre le fait d'être porteur de l'allèle *ε4* du gène codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE) et le fait de développer cette pathologie

[126]. L'ApoE est un transporteur des lipides, dont le cholestérol, Il semble de plus exister des facteurs de risque environnementaux tels que des facteurs cardiovasculaires (hypertension artérielle, AVC), l'hypercholestérolémie, le diabète, le tabac, le bas niveau d'études ou encore les symptômes dépressifs. Les femmes et les personnes avec des antécédents familiaux ont également plus de risque de développer cette maladie. À l'inverse, la richesse du réseau social et des activités de loisirs, une bonne hygiène de vie (activités physique et intellectuelle), un apport en antioxydants et une consommation modérée d'alcool semblent exercer des effets protecteurs [127].

Les mécanismes à l'origine de la maladie sont à l'heure actuelle encore mal connus. Dans la majorité des cas, la maladie d'Alzheimer apparaît comme une pathologie multifactorielle, résultant de l'interaction de divers facteurs génétiques et environnementaux qui pourraient favoriser son apparition.

1.1.3 Symptômes et caractéristiques neuro-pathologiques de la maladie

Les symptômes de la maladie évoluent progressivement au cours du temps. Ils se caractérisent au départ par la difficulté à mémoriser de nouvelles informations et par des troubles du langage et de l'orientation spatiale et temporelle. Au stade terminal, on constate la disparition de la mémoire à long terme, la faiblesse physique et la vulnérabilité aux infections. Le diagnostic définitif de la maladie se fait généralement par un examen du cerveau post-mortem, étant donné les nombreuses autres causes possibles de démence.

La maladie d'Alzheimer se caractérise en effet par deux lésions neuro-pathologiques : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (Fig. 3.1). Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires composés majoritairement de peptide amyloïde, appelé peptide Aβ (Fig.3.1.A). Ce peptide est issu du clivage de l'APP et est naturellement présent dans le cerveau mais dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il s'accumule en dehors des cellules en échappant aux systèmes biologiques d'élimination. Cette agrégation du peptide serait liée à la modification de ses propriétés structurales (avec un enrichissement en feuillets β plissés) provoquant son insolubilité et donc sa précipitation dans le tissu nerveux. Ce sont principalement les formes Aβ40 et Aβ42 (hétérogénéité au niveau carboxyterminal du peptide à 40 ou 42 acides aminés) que l'on retrouve dans les plaques séniles. On trouve également dans les plaques séniles du cholestérol [128], [129] ainsi que l'ApoE un transporteur du cholestérol [130].

L'autre lésion de la maladie d'Alzheimer est la dégénérescence neurofibrillaire (Fig.3.1.B). Les enchevêtrements neurofibrillaires sont des agrégats intracellulaires formés principalement de protéine *tau* anormalement phosphorylée. Le rôle physiologique de la protéine *tau* est de stabiliser les microtubules lors de leur polymérisation.

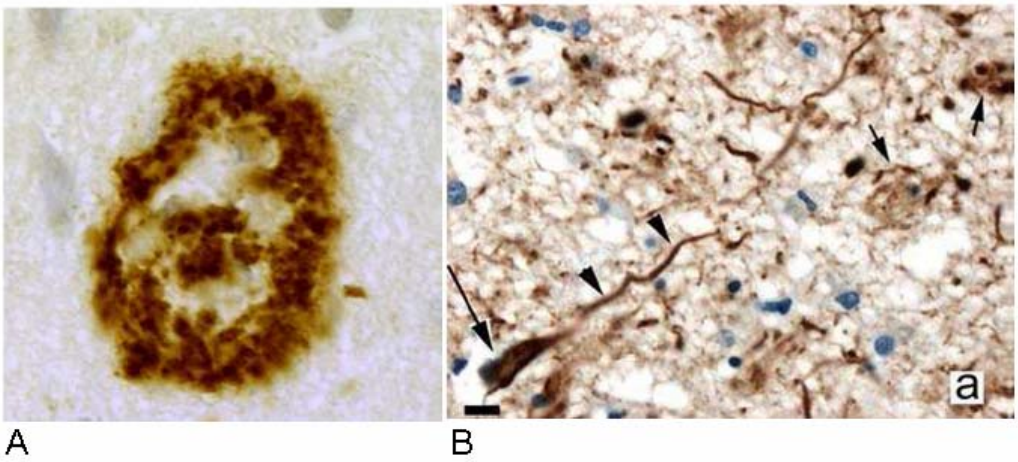


Fig.3.1: (A) Représentation d'une plaque sénile (communication personnelle, Maï Panchal, CRICM).
(B) Représentation d'une dégénérescence neurofibrillaire intraneuronale (flèches) chez une personne atteinte de la maladie d'Alzheimer [131].

Les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires se retrouvent principalement dans les régions cérébrales impliquées dans l'apprentissage, la mémoire et les émotions comme l'hippocampe [124]. La maladie d'Alzheimer se caractérise d'ailleurs également par une réduction en taille et un métabolisme diminué des zones du cerveau impliquées dans l'apprentissage et la mémoire, notamment les lobes temporaux et frontaux ainsi que l'hippocampe.

1.2 La protéine précurseur de l'amyloïde APP

L'APP est une protéine transmembranaire localisée à la membrane plasmique des cellules et dans les compartiments intracellulaires et dont la fonction est mal connue. Cette protéine peut suivre deux voies de clivage. La première voie dite non amyloïdogénique correspond au clivage par l' α-sécrétase puis par la γ-sécrétase (Fig.3.2). Cette voie de clivage n'induit pas de formation du peptide Aβ (d'où l'appellation non amyloïdogénique) et libère un fragment sAPPα neuro-protecteur.

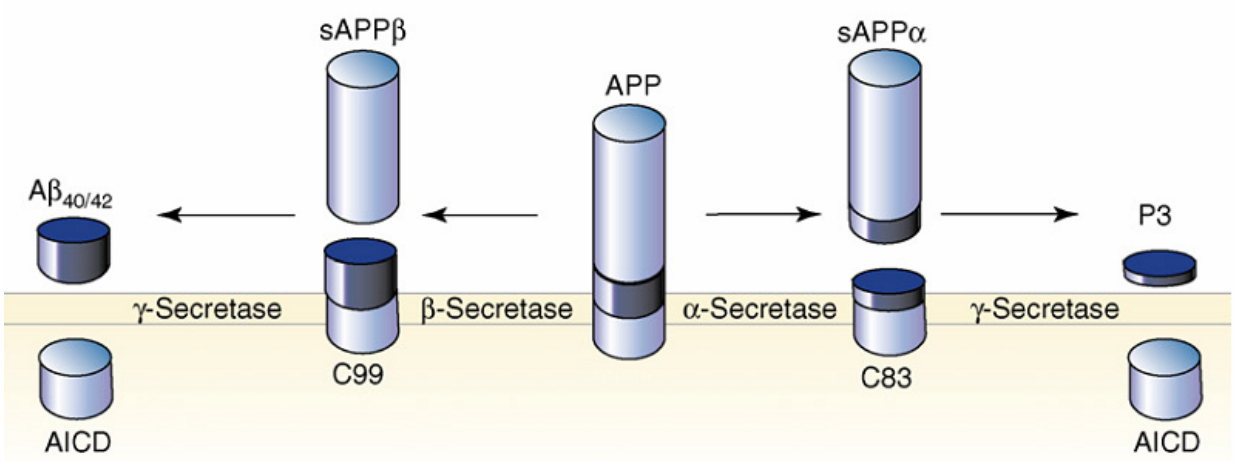


Fig.3.2: Schéma représentant la dynamique du clivage de l'APP à la membrane cytoplasmique [132].

La deuxième voie de clivage est la voie amyloïdogénique qui va aboutir à la production du peptide amyloïde. Elle nécessite deux clivages successifs par deux enzymes différentes : la β-sécrétase, également appelée BACE1, et la γ-sécrétase. Ce second clivage par la γ-sécrétase conditionne la nature de l'extrémité C-terminale du peptide et par conséquent la formation du peptide Aβ40 ou Aβ42.

La maladie d'Alzheimer serait donc liée à un déséquilibre entre ces deux voies de clivage de la protéine APP en faveur de la voie amyloïdogénique. Ce clivage amyloïdogénique a lieu partiellement à la membrane plasmique mais principalement lors du *trafficking* intracellulaire de l'APP (Fig.3.3). On pense que le premier clivage s'effectuerait majoritairement dans les endosomes précoces (vésicules d'internalisation provenant de la membrane plasmique) car l'activité de BACE1 est optimale à pH acide, ce qui est le cas dans les endosomes. Après son passage dans les endosomes précoces, l'APP peut être recyclée à la membrane plasmique ou dégradée dans les lysosomes (Fig.3.3).

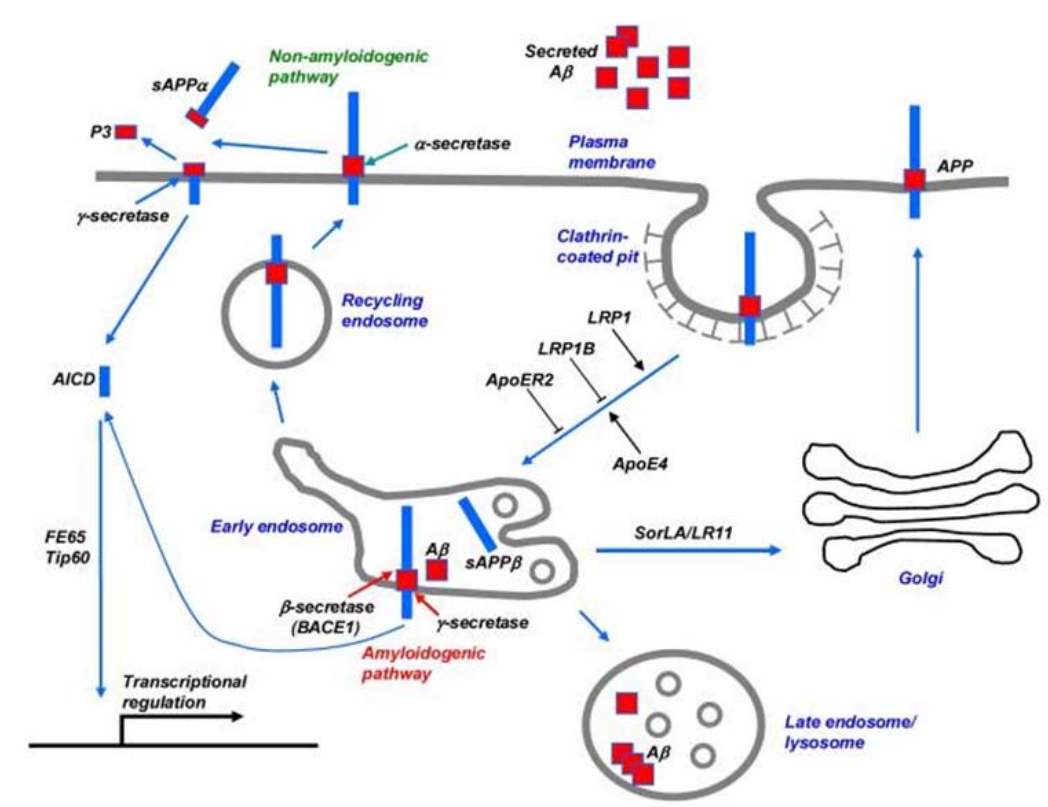


Fig.3.3: Schéma du trafficking intracellulaire de l'APP d'après [133].

1.3 Rôle du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer

Il est tout d'abord important de rappeler que le cholestérol présent dans le cerveau est différent du cholestérol sanguin. En effet, le cholestérol du cerveau (dans sa forme originelle) ne peut pas franchir la barrière hémato-encéphalique. De plus, les neurones matures ne synthétisent pas de cholestérol mais en ont besoin pour leur bon fonctionnement. Le cholestérol est synthetisé par les astrocytes (cellules gliales du système nerveux central) et transporté aux neurones matures par des transporteurs du cholestérol tels que ApoE.

Des études récentes convergent vers l'implication du cholestérol dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Par exemple, comme nous l'avons vu précédemment, le risque de développer une forme sporadique de la maladie d'Alzheimer est associé à l'allèle *ε4* du gène codant pour ApoE, [134]. Il a par ailleurs été constaté que le taux de cholestérol augmente dans le cerveau des patients atteints de cette maladie [129], [135]. De plus, des études réalisées *in vitro* suggèrent également que le taux de cholestérol peut jouer sur la localisation de l'APP et de ses enzymes de clivage à la membrane plasmique [136], [137]. Il a ainsi été montré qu'une diminution du taux de cholestérol au niveau de la membrane plasmique réduisait la quantité de peptide amyloïde produit [136], via une diminution de l'endocytose [138]. Alors que les effets de la diminution du cholestérol (via l'utilisation de la méthyl-β-cyclodextrin, MβCD) ont été très étudiés [135], [139], il y a très peu de données concernant les effets de l'augmentation du cholestérol sur la protéolyse de l'APP. Sur ce sujet, quelques études ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la β-sécrétase et de la production du peptide Aβ [135], [140].

Dans ce contexte, l'équipe de Marie-Claude Potier a récemment montré que l'augmentation du cholestérol membranaire induisait une augmentation de la production du peptide Aβ (Fig.3.4) ainsi qu'une augmentation de l'endocytose de l'APP [140].

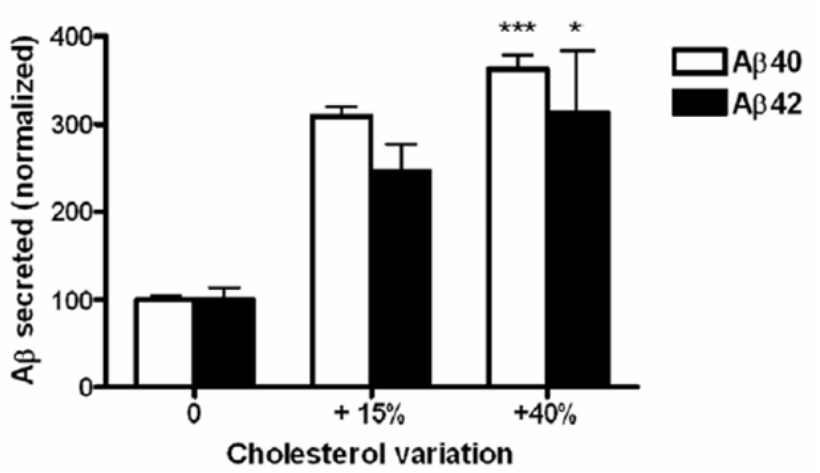


Fig.3.4: .Effet de l'augmentation du cholestérol membranaire sur la sécrétion du peptide amyloïde Aβ, mesuré dans des cellules HEK-293 [140].

Suite à ces résultats, nous avons voulu déterminer si cette augmentation de la production du peptide Aβ s'expliquait par une augmentation de l'activité catalytique de BACE1 ou par la plus grande accessibilité de BACE1 à son substrat APP, à la membrane plasmique des cellules et/ou dans des compartiments intracellulaires.

Ces études ont été faites dans un premier temps dans des cellules HEK-293 puis dans un second temps sur des cultures primaires de neurones issues d'hippocampe d'embryons de rat. L'équipe de Marie-Claude Potier a tout d'abord montré que l'augmentation de la production du peptide amyloïde ne résultait pas de l'augmentation de l'activité catalytique de BACE1 (Fig. 3.5), [81].

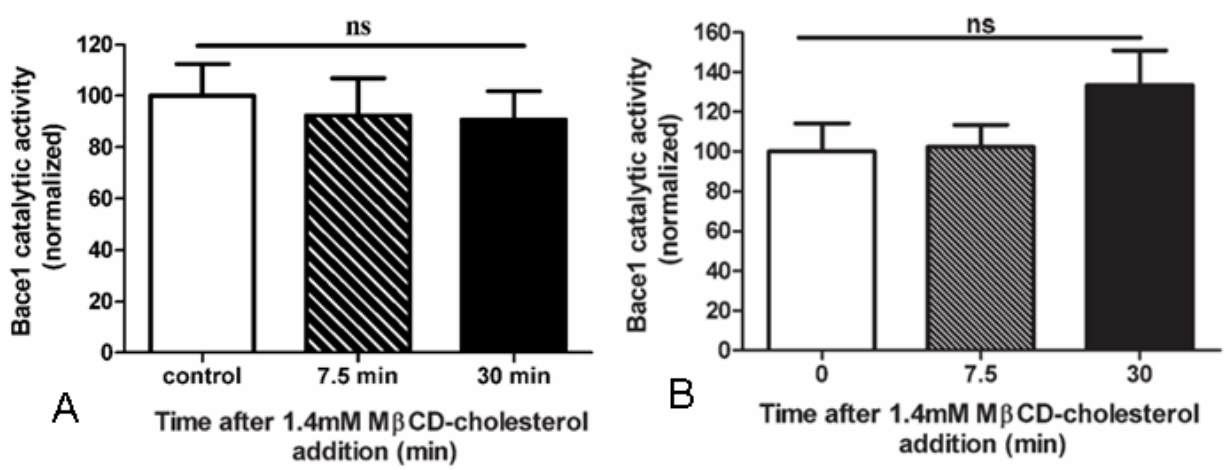


Fig.3.5:.Variations de l'activité catalytique de BACE1 en fonction du temps d'exposition avec le complexe MβCD-cholestérol, pour des cellules HEK-293 (A) et pour des neurones du cortex (B). Les données sont le résultat de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique ne permet pas de différencier l'activité de l'enzyme avant ou après 30 min d'exposition au complexe MβCD-cholestérol [81].

Nous nous sommes donc concentrés sur la seconde hypothèse et avons sondé la proximité spatiale de BACE1 et de son substrat APP par imagerie de FRET (cf. chapitre I). Cette étude a été réalisée à la fois à la membrane plasmique des cellules, en tirant parti d'une excitation sous onde évanescente (cf. chapitre II), et à l'intérieur des cellules en configuration simple en épifluorescence.

2 Suivi dynamique de l'effet du cholestérol sur l'interaction entre APP et BACE1 de la membrane plasmique à l'intérieur des cellules

2.1 Protocole

2.1.1 Types cellulaires utilisés

Nous avons utilisé deux types cellulaires différents : des lignées cellulaires HEK-293 et des cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat. Les cellules HEK-293 sont des cellules humaines embryonnaires de rein. Il s'agit de lignées cellulaires immortalisées par un adenovirus. Elles ont l'avantage de se diviser, de croître rapidement et de se comporter de façon homogène du fait de leur similarité génétique. Cependant ces cellules sont de moins bons modèles que les cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat pour étudier la maladie d'Alzheimer, qui touche principalement cette zone du cerveau comme nous l'avons vu précédemment. Les neurones d'hippocampe d'embryons de rat ont été disséqués et mis en culture par l'équipe de Frédéric Saudou de l'unité Signalisation, Neurobiologie et Cancer de l'Institut Curie d'Orsay (cf. Annexe III.2).

2.1.2 Couple FRET GFP/mCherry et conditions d'expression

Pour suivre l'interaction entre BACE1 et APP en utilisant l'imagerie de FRET, nous avons choisi d'utiliser le couple de fluorophores GFP/mCherry. Celui-ci remplit toutes les conditions pour permettre l'imagerie de FRET (cf. chapitre I). En effet, les spectres d'émission de la GFP et d'absorption de la mCherry se recouvrent, le maximum d'émission de la GFP se situant à 508 nm et le maximum d'absorption de la mCherry étant à 587 nm (Fig. 3.6).

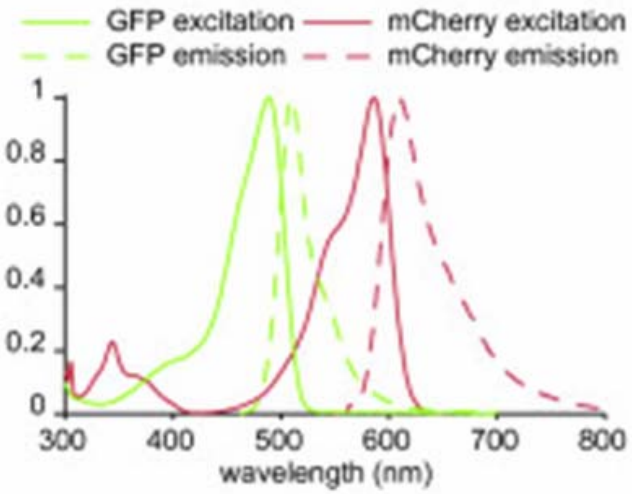


Fig.3.6: Spectres d'excitation et d'émission des fluorophores GFP et mCherry [http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/241/figure/F2].

Par ailleurs, ce couple FRET a une distance de Förster $R_0 = 47$Å [58]. Comme nous l'avons déjà démontré, l'efficacité du transfert dépend de la distance de Förster R_0 (pour laquelle il y a 50% d'efficacité de transfert).

Les plasmides d'intérêt ont été exprimés dans les cellules HEK-293 grâce au kit de transfection chimique *Effectene* (*Qiagen*, Annexe III.1) et dans les neurones d'hippocampe d'embryons de rat par électroporation (kit *Amaxa Nucleofector*, Annexe III.2). Cette dernière

technique consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes de la cellule qui sont ainsi déstabilisées et l'ADN présent dans l'espace extracellulaire peut alors pénétrer dans les cellules (Fig.3.2.1, Annexe III.2). L'électroporation des plasmides d'intérêt a été réalisée par l'équipe de Frédéric Saudou de l'unité Signalisation, Neurobiologie et Cancer de l'Institut Curie d'Orsay alors que les transfections chimiques ont été faites au laboratoire. Les cellules exprimaient BACE1-GFP (donneur seul) ou co-exprimaient BACE1-GFP (donneur) et APP-mCherry (accepteur). La première condition de transfection constitue l'expérience contrôle dans laquelle seul le donneur du couple FRET est présent alors que dans le second cas, c'est la mesure de FRET où donneur et accepteur sont tous les deux co-exprimés. Nous avons choisi un rapport d'¼ entre les quantités de plasmide du donneur et de l'accepteur après avoir testé et observé au microscope différentes gammes de concentration, pour obtenir une expression équivalente des deux protéines d'intérêt. En effet, à quantité d'ADN équivalente, l'expression de BACE1-GFP est beaucoup plus forte que celle d'APP-mCherry.

2.1.3 Mesures de durée de vie de fluorescence et effet du cholestérol

Afin d'augmenter le cholestérol cellulaire, nous avons utilisé un complexe méthyl-β-cyclodextrine/ cholestérol (MβCD-cholestérol, *Sigma*) qui a la particularité d'augmenter le cholestérol sélectivement au niveau de la membrane plasmique. Nous avons évalué l'effet du cholestérol sur l'interaction entre APP et BACE1 par des cinétiques. Nous avons ainsi mesuré la durée de vie de fluorescence du donneur seul (BACE1-GFP) et du donneur en présence de l'accepteur (APP-mCherry), en condition contrôle et à intervalle de temps régulier après l'ajout de 1,4 mM de MβCD-cholestérol (2, 5, 8, 12, 15, 20, 30 min après l'ajout). Le complexe MβCD-cholestérol était dilué dans du DMEM pour les HEK-293 ou dans du milieu neurobasal pour les neurones, après avoir préalablement effectué des rinçages avec ces mêmes milieux pour éliminer tous les résidus potentiels de lipides du sérum présent dans le milieu. Après 30 minutes de traitement, nous avons observé une augmentation du cholestérol de 40% ou de 30% dans le cas des cellules HEK-293 ou des neurones, respectivement (Fig.3.7). Cela a été évalué par quantification de la fluorescence de la filipin, un antibiotique fluorescent qui se lie au cholestérol.

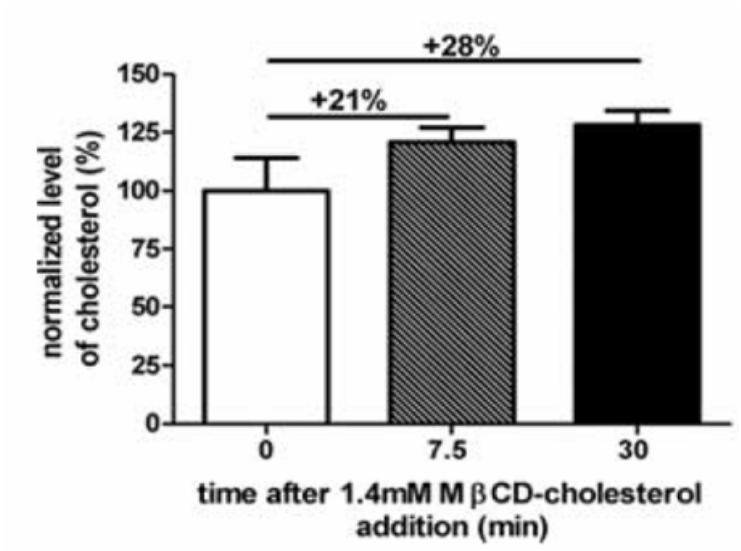


Fig.3.7: Quantification de l'effet de l'exposition à 1,4 mM de MβCD-cholestérol pour des neurones d'hippocampe d'embryons de rat, suivie d'un marquage à la filipin [81].

De façon à avoir un suivi dynamique de l'effet du cholestérol allant de la membrane plasmique vers le cytoplasme des cellules, des mesures de durée de vie de fluorescence ont été effectuées sous excitation TIRF et en épifluorescence de façon à détecter du FRET à la membrane plasmique et/ou au niveau du cytoplasme des cellules respectivement. Nous avons effectué des séries de mesure avec 13 portes temporelles de 800 ps de largeur, chaque acquisition correspondant à la moyenne de 10 images

(temps d'acquisition par porte temporelle 2,5 s) et la durée de vie de fluorescence a été calculée en utilisant un ajustement mono-exponentiel.

2.2 Analyse statistique

Pour mettre en évidence une interaction entre les deux protéines d'intérêt BACE1-GFP et APP-mCherry, nous avons utilisé l'imagerie de FRET sur notre dispositif TIRFLIM. Nous cherchons ainsi à détecter une diminution de la durée de vie du donneur (GFP) en présence de l'accepteur (mCherry) ce qui correspondra à la présence de FRET entre les deux protéines BACE1 et APP par rapport à la mesure de contrôle où le donneur est seul. De façon à pouvoir détecter une diminution de la durée de vie de fluorescence de la GFP qui soit significative et qui rende compte de la présence de FRET, nous avons effectué une analyse statistique (*GraphPad Prism 5.0 software*). Nous avons ainsi utilisé deux tests statistiques :

- un test statistique de Student t-test non apparié et sans *a priori* (*two tailed, unpaired t-test*) dans le cas où les variances de nos échantillons étaient comparables. Ce test compare les moyennes de deux groupes en supposant que les valeurs sont indépendantes et suivent une distribution gaussienne.
- un test non paramétrique t-test avec correction de Welch dans le cas où les variances étaient significativement différentes. Dans ce test, aucune hypothèse n'est faite sur la distribution des données.

Ces tests extraient la *p*-value, indicateur qui permet de voir si l'on peut différencier les deux populations. En effet, en considérant que les deux populations ont la même moyenne, la *p*-value donnera la probabilité qu'il y a d'observer une différence suffisamment grande entre les moyennes associées aux deux échantillons (ou plus grande que celle obtenue dans le cas où l'hypothèse nulle est vraie, ce qui signifie que les deux groupes sont identiques). Cette probabilité varie entre 0 et 1. Ainsi plus la *p*-value sera petite, plus la différence entre les moyennes associées aux deux populations a peu de chance d'être une coïncidence. Ces analyses nous permettent donc de savoir, en fonction des conditions expérimentales, si les durées de vie de fluorescence de la GFP seule sont significativement différentes des durées de vie de la GFP en présence de la mCherry ou si cette différence est uniquement liée au hasard.

2.3 Résultats obtenus

Nous avons mesuré la durée de vie de fluorescence de BACE1-GFP à différents temps après l'ajout du cholestérol en cellules pour avoir un suivi dynamique de son effet. Des mesures et des analyses statistiques ont ainsi été effectuées avant l'ajout du cholestérol, aux temps courts et aux temps longs après cet ajout.

2.3.1 Contrôle de la stabilité de la durée de vie de la GFP au cours du temps

Pour être sûr que les modifications de la durée de vie de fluorescence de la GFP sont liées uniquement à l'ajout du cholestérol, la durée de vie de BACE1-GFP en présence d'APP-mCherry a été suivie au cours du temps. Des cinétiques de contrôle sans ajout de cholestérol ont donc été réalisées pour des cellules HEK-293 ainsi que pour des neurones d'hippocampe d'embryon de rat, en excitation en épifluorescence et sous excitation TIRF pour vérifier la stabilité de la durée de vie de fluorescence de BACE1-GFP au cours du temps.

Pour les expériences effectuées sur les cellules HEK-293, pour une excitation en épifluorescence, la durée de vie était stable au cours du temps avec une erreur moyenne globale de 5,4 ± 1,3 ps (erreur moyenne calculée sur 8 temps et pour 9 cellules au cours de 2 expériences indépendantes). En TIRF, cette durée de vie était également stable avec une erreur moyenne globale de 7,8 ± 1,9 ps (8 temps, 6 cellules, 2 expériences indépendantes). L'erreur associée à ces valeurs est assez importante en raison du faible nombre d'échantillons analysés dans chaque cas.

Pour les expériences effectuées sur les neurones dans le cas d'une excitation en TIRF, la durée de vie était stable avec une erreur moyenne de 11,7 ± 0,8 ps (8 temps, 25 neurones, 4 expériences indépendantes). De même pour une excitation en épifluorescence, la durée de vie était stable au cours du temps avec une erreur moyenne de 12,6 ± 1,0 ps (8 temps, 25 neurones, 5 expériences indépendantes). Cela montre que sans ajout de cholestérol et en présence de l'accepteur la durée de vie de BACE1-GFP ne varie pas au cours du temps.

Les résultats obtenus au cours des cinétiques seront d'abord présentés pour les cellules HEK-293 puis pour les neurones d'hippocampe d'embryons de rat.

2.3.2 Résultats obtenus en cellules HEK-293

Des mesures ont dans un premier temps été effectuées sur des cellules HEK-293 en condition contrôle (avec BACE1-GFP uniquement) ou après avoir fait varier la quantité de cholestérol membranaire sous excitation TIRF et en épifluorescence (Fig.3.8).

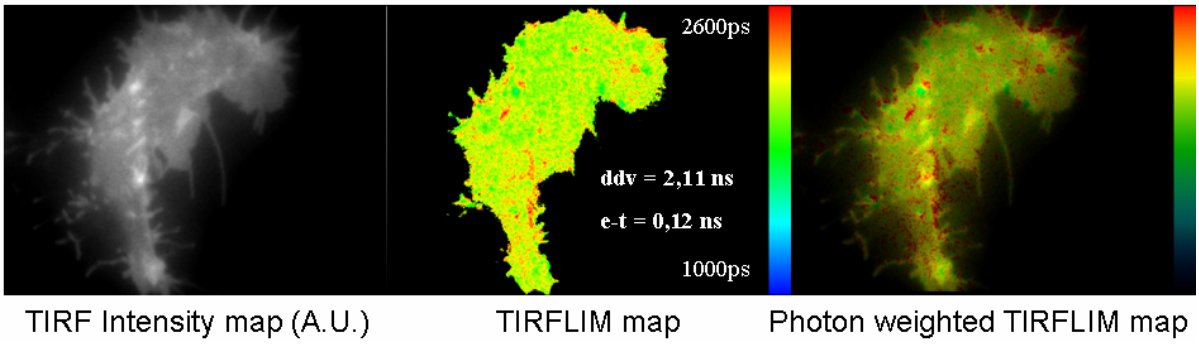


Fig.3.8: Image d'intensité de fluorescence (à gauche), carte de répartition de durée de vie de fluorescence pixel par pixel (« TIRFLIM map », au centre) et combinaison d'intensité et de durée de vie (« photon-weighted TIRFLIM map », à droite) obtenues sur une cellule HEK-293 co-exprimant BACE1-GFP et APP-mCherry pour une excitation en TIRF. La durée de vie moyenne (ddv) et l'écart type (e-t) associés à la distribution de la durée de vie de fluorescence de BACE1-GFP sont indiqués.

2.3.2.1 Avant ajout du cholestérol

De façon à suivre l'évolution de la durée de vie de la GFP à différents temps après l'ajout du cholestérol, des mesures ont dans un premier temps été effectuées en condition contrôle de cholestérol membranaire, sous excitation TIRF et en épifluorescence. Nous avons ainsi mesuré les durées de vie de fluorescence de la GFP en présence et en absence de la mCherry pour un grand nombre de cellules, obtenues lors de différentes transfections, de façon à pouvoir effectuer une analyse statistique sur ces données. Les valeurs moyennes des durées de vie obtenues pour les différentes conditions expérimentales, sont regroupées dans le tableau 3.1.

Nous avons constaté qu'avant l'ajout du cholestérol, que ce soit avec une excitation en TIRF ou en épifluorescence, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les durées de vie de BACE1-GFP en présence et en absence d'APP-mCherry ($p = 0,5978$ en excitation TIRF et $p = 0,1007$ en épifluorescence). Nous n'avons donc détecté aucune interaction de type FRET avant l'ajout du cholestérol à la membrane ou intracellulairement. Nous n'avons pas pu mettre en évidence avec cette technique une proximité à la membrane ou dans la cellule entre BACE1 et APP avant l'ajout du cholestérol.

Donneur	Accepteur	Illumination	Temps après ajout du cholestérol	Nombre de cellules	Durée de vie moyenne du donneur ± sem (ps)	*p*-value
Bace1-GFP	-	TIRF	avant	46	2215 ± 6	ns (p = 0,5978)[a]
Bace1-GFP	APP-mCherry	TIRF	avant	33	2221± 10	
Bace1-GFP	-	Epifluorescence	avant	29	2221 ± 6	ns (p = 0,1007)
Bace1-GFP	APP-mCherry	Epifluorescence	avant	36	2207 ± 6	

[a] p-value obtenue avec un t-test non apparié (*two-tailed unpaired t-test*), sans *a priori* sur les échantillons avec une correction de Welch et un intervalle de confiance de 95%.

Tab. 3.1: Durée de vie de fluorescence moyenne du donneur BACE1-GFP en présence ou en absence de l'accepteur de FRET APP-mCherry sous excitation TIRF ou en épifluorescence avant ajout du cholestérol dans le milieu extracellulaire de cellules HEK-293 en culture.

2.3.2.2 Effet aux temps courts après ajout du cholestérol (0-8 min)

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'effet de l'ajout d'1,4 mM de MβCD-cholestérol dans le milieu extra-cellulaire sur l'interaction APP/BACE1. Nous nous sommes d'abord concentrés sur la période de temps précédant l'endocytose, soit avant 10 minutes. Après ce laps de temps, les différentes molécules présentes à la membrane plasmique des cellules seront internalisées et dirigées vers les différents compartiments cellulaires. Nous avons choisi comme indicateur la pente associée à la variation de la durée de vie de fluorescence de BACE1-GFP, en présence et en absence d'APP-mCherry, entre 2 et 8 min après l'ajout du cholestérol. En effet, l'évolution de cette pente pour BACE1-GFP seul et en présence d'APP-mCherry rendra compte de l'effet du cholestérol sur la durée de vie de fluorescence de la GFP et toute diminution dans le cas où l'accepteur est présent, mettra en évidence la présence de FRET.

Pour une excitation en TIRF, nous avons ainsi mesuré une pente de -6,1 ± 1,4 (n = 9) pour BACE1-GFP en présence d'APP-mCherry et une pente de -0,6 ± 1,3 (n = 12) pour BACE1-GFP seul (Fig.3.9.A). La pente mesurée entre 2 et 8 minutes était plus faible en présence de l'accepteur (t-test non apparié p = 0,011) par conséquent la durée de vie de la GFP a diminué en présence de l'accepteur à la membrane plasmique des cellules. Ce résultat rend compte que du FRET a bien lieu et cela traduit également le fait qu'aux temps courts après l'ajout de cholestérol, on a une augmentation de la proximité entre APP et BACE1 à la membrane plasmique des cellules.

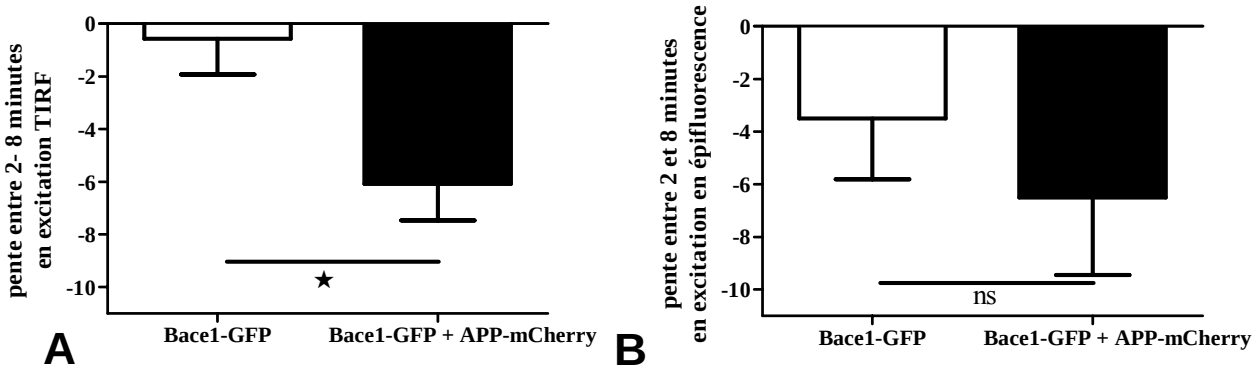


Fig. 3.9 : Pentes associées à la variation de la durée de vie de fluorescence de BACE1-GFP en présence (noir) ou en absence d'APP-mCherry (blanc) sous excitation TIRF (A) ou en épifluorescence (B) entre 2 et 8 minutes après ajout du cholestérol.

Pour évaluer l'effet du cholestérol au niveau intracellulaire, nous nous sommes placés en excitation en épifluorescence. Nous avons alors mesuré une pente de -6,5 ± 2,9 (n = 7) pour BACE1-GFP en présence d'APP-mCherry et de -3,5 ± 2,3 (n = 10) pour BACE1-GFP seul. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux pentes (t-test non apparié $p = 0,4293$, ns) (Fig.3.9.B). Nous en avons donc déduit qu'aux temps courts, le cholestérol n'a pas d'effet sur la proximité entre APP et BACE1 à l'intérieur de la cellule.

2.3.2.3 Effet aux temps longs après ajout du cholestérol (30 min)

Nous avons ensuite comparé les durées de vie de fluorescence de BACE1-GFP en présence et en absence d'APP-mCherry après l'endocytose, 30 min après l'ajout du cholestérol (Tab.3.2). Sous excitation TIRF, la présence de l'accepteur n'a pas d'incidence sur les durées de vie de fluorescence moyennes mesurées et ne permet pas de différencier les deux populations (t-test non apparié $p = 0,0532$, ns). Pour une excitation en épifluorescence, nous avons constaté une diminution de la durée de vie moyenne de BACE1-GFP lorsqu'il est en présence d'APP-mCherry. Cette diminution est statistiquement significative (Tab.3.2). Cela traduit donc la présence de FRET, qui rend compte de l'augmentation de la proximité entre BACE1 et APP aux temps longs après ajout du cholestérol.

Donneur	Accepteur	Illumination	Temps après ajout du cholestérol	Nombre de cellules	Durée de vie moyenne du donneur ± sem (ps)	*p*-value
Bace1-GFP	-	TIRF	t = 30 min	46	2237 ± 8	ns (*p*=0,0532)
Bace1-GFP	APP-mCherry	TIRF	t = 30 min	55	2218 ± 6	
Bace1-GFP	-	Epifluorescence	t = 30 min	34	2250 ± 11	***(*p*=0,0128)**
Bace1-GFP	APP-mCherry	Epifluorescence	t = 30 min	41	2215 ± 8	

[a] *p*-value obtenue avec un t-test non apparié (*two-tailed unpaired t-test*), sans *a priori* sur les échantillons avec une correction de Welch et un intervalle de confiance de 95%.

Tab.3.2: Durée de vie de fluorescence moyenne du donneur BACE1-GFP en présence ou en absence de l'accepteur de FRET APP-mCherry sous excitation TIRF ou en épifluorescence 30 min après l'ajout du cholestérol dans le milieu extracellulaire de cellules HEK-293 en culture.

Nous avons ainsi mis en évidence que dans des cellules HEK-293, aux temps courts après l'ajout du cholestérol correspondant à la période précédant l'endocytose, le cholestérol induit une augmentation de la proximité entre BACE1 et APP et ce uniquement à la membrane plasmique. Cette proximité se retrouve plus tard spécifiquement à l'intérieur de la cellule.

2.3.3 Résultats obtenus sur des neurones d'hippocampe d'embryons de rat

Après avoir réalisé les premières expériences sur des cellules HEK-293 et mis en évidence des variations de la proximité entre APP et BACE1 sous l'effet du cholestérol, nous avons effectué les mêmes expériences pour les deux types d'excitation en TIRF et en épifluorescence dans des neurones d'hippocampe d'embryons de rat (Fig.3.10).

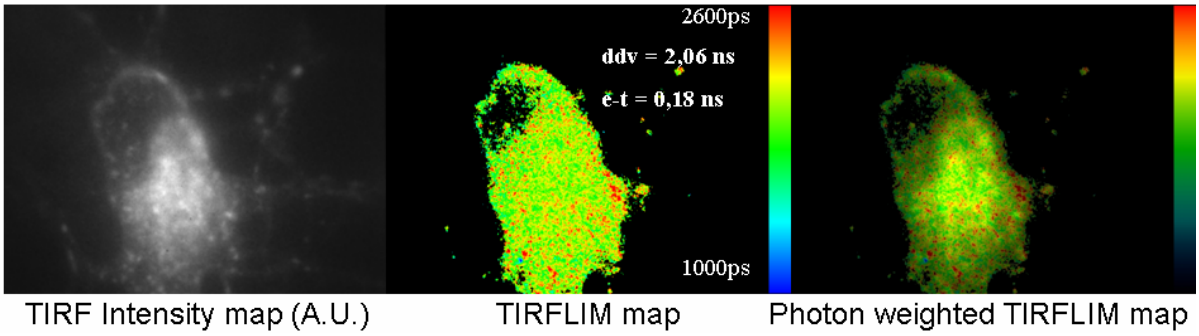


Fig.3.10: Image d'intensité de fluorescence (à gauche), carte de répartition de durée de vie de fluorescence pixel par pixel (« TIRFLIM map », au centre) et combinaison d'intensité et de durée de vie (« photon-weighted TIRFLIM map », à droite) obtenues sur un neurone co-exprimant BACE1-GFP et APP-mCherry pour une excitation en TIRF. La durée de vie moyenne (ddv) et l'écart type (e-t) associés à la distribution de la durée de vie de fluorescence de BACE1-GFP sont indiqués.

2.3.3.1 Avant ajout du cholestérol

Les résultats sont regroupés dans le tableau 3.3. En condition contrôle de cholestérol membranaire, la durée de vie de fluorescence du donneur est significativement diminuée en présence de l'accepteur APP-mCherry à la membrane plasmique des cellules (t-test avec correction de Welch $p = 0{,}006$), ce qui indique que du FRET a lieu sous excitation TIRF (Tab.3.3). Nous en déduisons donc que dans les neurones, avant l'ajout du cholestérol, il y a une proximité entre BACE1 et APP au niveau de la membrane plasmique. En épifluorescence, l'analyse statistique effectuée ne permet pas de différencier les deux populations mais est très proche du cas significatif.

Donneur	Accepteur	Illumination	Temps après ajout du cholestérol	Nombre de neurones	Durée de vie moyenne du donneur ± sem (ps)	*p*-value
Bace1-GFP	-	TIRF	avant	72	2200 ± 7	**** (*p*=0,006)**
Bace1-GFP	APP-mCherry	TIRF	avant	64	2169 ± 8	
Bace1-GFP	-	Epifluorescence	avant	58	2327 ± 11	ns (*p*=0,0505)
Bace1-GFP	APP-mCherry	Epifluorescence	avant	67	2294 ± 13	

[a] *p*-value obtenue avec un t-test non apparié (*two-tailed unpaired t-test*), sans *a priori* sur les échantillons avec une correction de Welch et un intervalle de confiance de 95%.

Tab. 3.3 : Durée de vie de fluorescence moyenne du donneur BACE1-GFP en présence ou en absence de l'accepteur de FRET APP-mCherry sous excitation TIRF ou en épifluorescence avant ajout du cholestérol dans le milieu extracellulaire de neurones en culture.

Ces premiers résultats montrent donc qu'avant l'ajout du cholestérol, il existe déjà une interaction entre BACE1 et APP à la membrane plasmique des cellules que nous n'avions pas détectée en cellules HEK-293.

2.3.3.2 Effet aux temps courts après ajout du cholestérol (0-8 min)

Nous avons ensuite mis les neurones en présence d'1,4 mM de complexe MβCD-cholestérol au temps 0 et suivi la durée de vie de fluorescence du donneur pendant 30 minutes. Nous avons d'abord étudié l'effet du cholestérol sur la durée de vie de fluorescence de BACE1-GFP entre 2 et 8 minutes après l'ajout du cholestérol (Fig.3.11.A). Nous avons ainsi mesuré une pente de -0,5 ± 1,2 (n = 18) pour BACE1-GFP seul qui diminue à -4,0 ± 1,2 (n = 23) en présence de l'accepteur (t-test non apparié

p = 0,048). L'augmentation du cholestérol membranaire se traduit donc par une diminution de la pente associée aux mesures de durée de vie de fluorescence de la GFP en présence de la mCherry entre 2 et 8 minutes après l'ajout de cholestérol, en comparaison avec les mesures où le donneur était seul (Fig.3.11.B). Comme les mesures de FLIM/FRET sont indépendantes de la concentration du fluorophore, nous en déduisons que la diminution de la pente correspond à la diminution de la durée de vie du donneur en présence de l'accepteur. Cela traduit donc une augmentation du FRET et par conséquent une plus grande interaction entre BACE1-GFP et APP-mCherry aux temps courts (< 8 min) après ajout du cholestérol, avant l'endocytose.

Les mêmes mesures ont été effectuées avec une excitation en épifluorescence. Nous avons ainsi mesuré une pente de -5,2 ± 3,0 correspondant aux durées de vie de BACE1-GFP seul (n = 13) entre 2 et 8 minutes après ajout du cholestérol contre -4,1 ± 2,3 pour BACE1-GFP en présence d'APP-mCherry (n = 24). Le test de Student ne permet pas de différencier ces deux populations (t-test non apparié p = 0,7821, ns) (Fig.3.11.C). Nous en avons déduit qu'aux temps courts le cholestérol n'a pas d'effet sur la proximité entre BACE1 et APP au niveau du cytoplasme de la cellule.

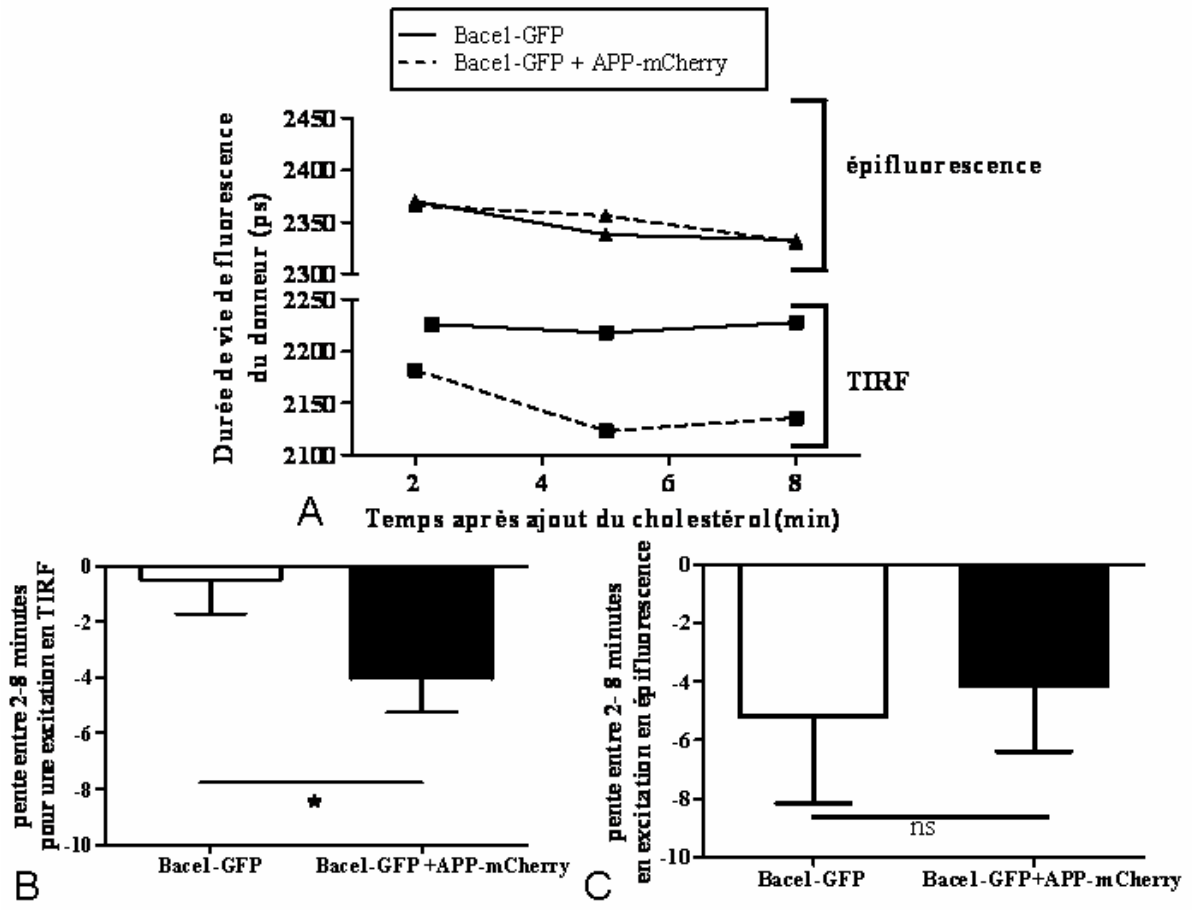


*Fig. 3.11 : Augmentation du FRET aux temps courts après l'ajout du cholestérol à la membrane plasmique des neurones mais pas dans le cytosol. Les cultures primaires d'hippocampe d'embryons de rat étaient exposées à 1,4 mM MβCD cholestérol. (A) Variations représentatives de la durée de vie de fluorescence du donneur BACE1-GFP en présence (- - -) ou en absence de l'accepteur APP-mCherry (——) en fonction du temps d'exposition au cholestérol sous excitation TIRF (■) ou en épifluorescence (▲). (B) &(C) Calcul de la pente entre 2 et 8 minutes pour les cinétiques obtenues, pour BACE1-GFP seul (blanc) ou en présence d'APP-mCherry (noir) sous excitation TIRF (B) ou en épifluorescence (C) ns : non significatif. * p < 0,005 t-test non apparié avec un intervalle de confiance de 95%.*

Ainsi l'augmentation du cholestérol membranaire entraîne une augmentation de la proximité entre BACE1 et APP spécifiquement à la membrane plasmique des neurones.

2.3.3.3 Effet aux temps longs après ajout du cholestérol (30 min)

Les mêmes mesures que celles effectuées avant l'ajout du cholestérol ont été faites 30 min après cet ajout pour une excitation en TIRF et en épifluorescence (Tab.3.4). A la membrane plasmique des cellules aux temps longs après l'ajout du cholestérol, l'analyse statistique (t-test non apparié avec correction de Welch, $p = 0,1897$) ne permet pas de différencier les durées de vie de BACE1-GFP en présence ou en absence de l'accepteur APP-mCherry. Nous ne retrouvons donc pas la proximité entre BACE1 et APP à la membrane plasmique, que nous avions détectée avant l'ajout du cholestérol.

En excitation en épifluorescence, 30 minutes après l'ajout du cholestérol, nous avons constaté que la durée de vie de fluorescence du donneur BACE1-GFP était significativement diminuée en présence de l'accepteur APP-mCherry (t-test non apparié avec la correction de Welch, $p = 0,0009$). Nous en avons donc déduit que du FRET a lieu entre BACE1-GFP et APP-mCherry (Tab. 3.4). Ainsi, après 30 minutes d'exposition au cholestérol, APP et BACE1 sont à proximité dans l'espace cytoplasmique du neurone.

Donneur	Accepteur	Illumination	Temps après ajout du cholestérol	Nombre de neurones	Durée de vie moyenne du donneur ± sem (ps)	*p*-value
Bace1-GFP	-	TIRF	30 min	92	2191 ± 10	ns ($p = 0,1897$)[a]
Bace1-GFP	APP-mCherry	TIRF	30 min	83	2169 ± 13	
Bace1-GFP	-	Epifluorescence	30 min	57	2363 ± 18	***($p = 0,0009$)[a]
Bace1-GFP	APP-mCherry	Epifluorescence	30 min	74	2291 ± 11	

[a] *p*-value obtenue avec un t-test non apparié (*two-tailed unpaired t-test*), sans *a priori* sur les échantillons avec une correction de Welch et un intervalle de confiance de 95%.

Tab. 3.4 Durée de vie de fluorescence moyenne du donneur BACE1-GFP en présence ou en absence de l'accepteur de FRET APP-mCherry sous excitation TIRF ou en épifluorescence 30 min après l'ajout du cholestérol dans le milieu extracellulaire de neurones en culture.

2.3.4 Synthèse des résultats et discussion

Des études préalables, réalisées dans l'équipe de Marie-Claude Potier, ont montré qu'une augmentation du cholestérol à la membrane plasmique des cellules induisait une augmentation de la production du peptide Aβ ainsi qu'une augmentation de l'endocytose de l'APP [140]. Nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes régissant l'augmentation de la production du peptide amyloïde sous l'effet du cholestérol. Nous avons montré dans un premier temps que cette augmentation ne résulte pas de l'augmentation de l'activité catalytique de BACE1 (Fig.3.5). Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au devenir de la proximité entre BACE1 et APP lors d'une modification à la hausse du cholestérol membranaire.

Grâce à notre microscope TIRFLIM et à l'imagerie de FRET, nous avons pu effectuer un suivi dynamique de l'interaction APP/BACE1 allant de la membrane plasmique des cellules jusqu'au cytoplasme de la cellule (Fig.3.12). Cette étude a été réalisée sur des lignées cellulaires HEK-293 et des cultures primaires de neurones d'embryons de rat. Nous avons pu constater des différences dans la proximité d'APP et de BACE1 en condition contrôle de cholestérol membranaire entre ces deux modèles cellulaires mais la réponse au traitement par la MβCD-cholestérol semble similaire. Dans la suite de la discussion, nous nous concentrerons sur le modèle cellulaire le plus pertinent pour l'étude des mécanismes de la maladie d'Alzheimer : les cultures primaires de neurones.

Nous avons ainsi montré qu'avant augmentation du cholestérol membranaire, il existe une proximité entre APP et BACE1 à la membrane plasmique des neurones. Lorsque le cholestérol membranaire augmente, cela va induire aux temps courts après l'ajout (< 10 min), une augmentation de la proximité entre APP et BACE1 spécifiquement à la membrane plasmique. Aux temps plus longs (> 30 min), on retrouve la proximité entre APP et BACE1 mais cette fois uniquement au niveau du cytoplasme la cellule (Fig. 3.12).

Etant donné que l'enzyme de clivage BACE1 est préférentiellement active dans les endosomes en raison de l'acidité de leur pH (pH = 5,5-6), l'augmentation de la proximité intracellulaire entre APP et BACE1 aux temps longs après l'ajout du cholestérol va dans le sens de l'augmentation de la production du peptide.

Cette étude a ainsi permis de mettre en évidence la présence d'une interaction entre deux protéines d'intérêt grâce à l'imagerie de FRET de façon qualitative. Cependant, il pourrait être intéressant d'avoir accès à un aspect plus quantitatif, en particulier en ce qui concerne les proportions de molécules en interaction. Ceci pourrait être réalisé en utilisant une analyse bi-exponentielle des déclins de durée de vie de fluorescence. Toutefois, si le comportement du déclin n'est pas parfaitement bi-exponentiel, il est difficile d'extraire à la fois la fraction de molécules en interaction et la durée de vie de fluorescence τ_F associée, de façon indépendante. Une méthode alternative consiste à recourir à des analyses sans ajustement et qui ne présupposent donc pas un comportement mono- ou bi-exponentiel du déclin. On peut par exemple utiliser la représentation polaire ou *phasor* [57] ou la méthode d'analyse mf_D qui permet d'extraire la fraction minimale de donneur en interaction sans aucun ajustement [58]. Ces techniques d'analyse sont particulièrement intéressantes dans le cas où l'on a peu de photons, ce qui constitue une contrainte supplémentaire pour avoir un bon ajustement mono- ou bi-exponentiel.

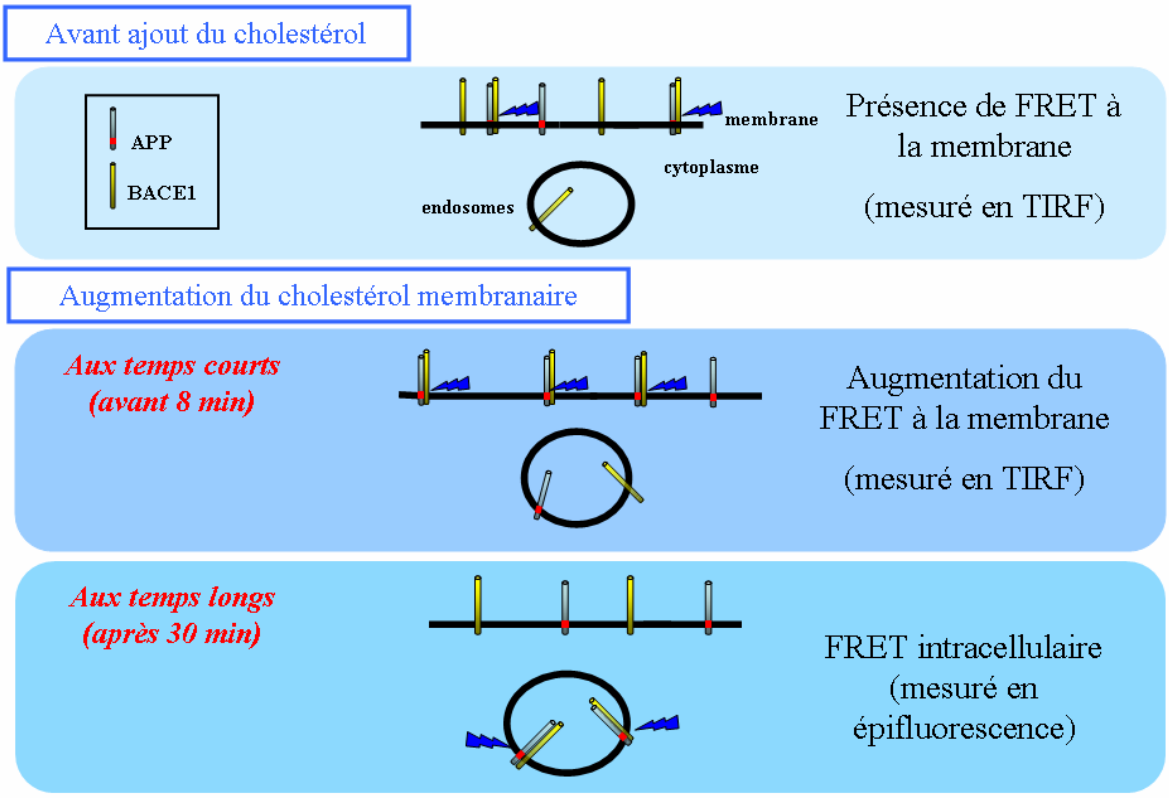


Fig. 3.12: Schéma récapitulatif de l'effet de l'augmentation du cholestérol membranaire sur l'interaction entre APP et BACE1 à la membrane plasmique et à l'intérieur des cellules. Les « éclairs » bleus symbolisent un clivage potentiel d'APP par BACE1.

Les expériences de TIRFLIM-FRET suggèrent donc que le cholestérol a une influence sur la distribution des deux protéines d'intérêt APP et BACE1 et donc sur l'accessibilité de BACE1 à son substrat APP. En particulier, l'augmentation du cholestérol membranaire semble entraîner un rapprochement entre APP et BACE1 à la membrane plasmique. Nos collègues neurobiologistes ont fait l'hypothèse que les radeaux lipidiques (*lipid rafts*) pourraient être impliqués dans ce rapprochement. Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol (Fig.3.13), qui joueraient un rôle dans divers processus physiologiques comme la signalisation cellulaire ou l'endocytose [141-144]. On estime leur taille à environ 20 nm de diamètre [145], ce qui exclut leur visualisation par microscopie photonique classique.

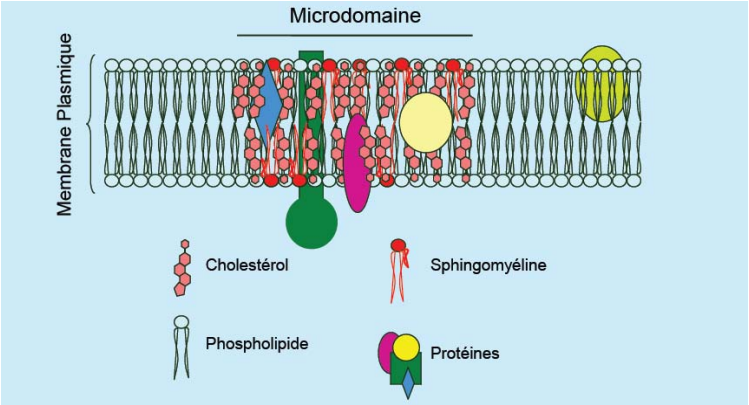


Fig. 3.13 : Schéma représentant un raft ou radeau lipidique

La répartition d'APP-YFP et de BACE1-GFP dans les radeaux lipidiques a donc été étudiée par une autre technique complémentaire présente au laboratoire : la FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*), (cf. chapitre I). En effet, quand une protéine est répartie dans et hors des radeaux lipidiques, les courbes de FCS (courbes d'auto-correlation) associées présentent deux temps de diffusion : un temps de diffusion rapide correspondant à une diffusion hors des radeaux lipidiques et un temps de diffusion plus long, correspondant à une diffusion dans les radeaux lipidiques. Il a ainsi été montré qu'en condition contrôle de cholestérol membranaire, APP et BACE1 avaient des temps de diffusion similaires dans les radeaux lipidiques, ce qui rend possible leur interaction dans ces microdomaines. Il a de plus été mis en évidence qu'à un moment précis après l'ajout du cholestérol (7 min), APP, qui était principalement en dehors des radeaux lipidiques, est relocalisée vers les radeaux lipidiques de la membrane plasmique, avant d'être rapidement endocytée. Cette endocytose n'est plus observée en présence de dynasore (un inhibiteur de l'endocytose contrôlée par la dynamine). Aux temps longs après l'ajout du cholestérol (> 30 min), les temps de diffusion d'APP-YFP et de BACE1-GFP dans les radeaux lipidiques sont différents, ce qui indique qu'APP et BACE1 ne sont plus dans les mêmes micro-domaines [81].

Ces observations sont en accord avec nos résultats de TIRFLIM-FRET. En effet, avant l'ajout du cholestérol, une faible proportion d'APP se trouve dans les radeaux lipidiques. Ces radeaux lipidiques ont des propriétés de diffusion similaires à ceux dans lesquels se trouve BACE1. APP et BACE1 pourraient donc être à proximité dans ces radeaux lipidiques et un transfert de FRET pourrait donc avoir lieu entre les deux protéines au sein de ces micro-domaines. Les données de FCS nous apprennent que l'augmentation du cholestérol membranaire va tout d'abord induire la relocalisation d'APP dans les radeaux lipidiques où elle va retrouver BACE1. On observe en effet de façon concomitante une augmentation du FRET APP/BACE1, qui traduirait une augmentation de la proximité entre APP et BACE1 au sein des radeaux lipidiques. Aux temps longs après l'ajout du cholestérol, nous avons observé une augmentation de la proximité entre APP et BACE1 intra-cellulairement mais pas à la membrane des cellules, ce qui est en accord avec les temps de diffusion qui diffèrent pour les deux molécules qui se retrouveraient donc dans des radeaux lipidiques différents.

Les résultats de cette étude montrent que l'augmentation du cholestérol membranaire n'induit pas une augmentation de la production du peptide Aβ en ayant un effet sur l'activité catalytique de BACE1 mais plutôt en jouant sur l'accessibilité de BACE1 à son substrat APP au niveau des radeaux lipidiques. BACE1 et APP seront ensuite rapidement endocytés et on les retrouvera à proximité à l'intérieur des neurones. Il a d'ailleurs été montré qu'après une modulation à la hausse du cholestérol membranaire, on observait une augmentation de l'endocytose de l'APP ainsi que l'élargissement des endosomes [140], [146].

Le cholestérol (notamment dans les radeaux lipidiques) semble avoir un rôle important dans la production du peptide amyloïde. Ces micro-domaines pourraient donc jouer un rôle essentiel dans la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été démontré qu'un inhibiteur de BACE1 ancré au niveau des radeaux lipidiques était beaucoup plus efficace pour réduire les quantités de peptide Aβ dans l'hippocampe, chez des souris atteintes de la maladie, que lorsque l'inhibiteur était associé à son équivalent soluble [147]. Les radeaux lipidiques seraient alors une cible thérapeutique prometteuse dans le cadre de cette pathologie.

Cependant, il faut garder en tête que de nombreux acteurs protéiques ou lipidiques peuvent intervenir dans la production du peptide Aβ ainsi que dans l'endocytose de l'APP. On peut citer par exemple le cas de la flotilline, protéine présente dans les radeaux lipidiques [137]. De plus, un équilibre reste à trouver pour réguler la production du peptide Aβ car sa déplétion complète ou partielle pourrait avoir des effets délétères [148]. Les protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer sont en outre impliquées dans des processus physiologiques essentiels (*tau* et la stabilisation des microtubules, la γ-sécrétase et le clivage de Notch) et doivent donc être régulées dans une optique thérapeutique en connaissance de cause.

Le développement de nouvelles techniques de microscopie permet ainsi de mieux sonder les interactions protéiques qui ont lieu dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, notamment entre APP et BACE1. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents au développement de la maladie d'Alzheimer, il serait intéressant d'étudier l'homodimérisation d'APP ou de BACE1 ainsi que l'effet de leur homodimérisation sur l'interaction entre ces deux protéines. Il a en effet été montré qu'APP et BACE1 pouvaient former des homodimères [149]. En revanche, l'effet de l'homodimérisation d'APP ou de BACE1 sur la production du peptide amyloïde reste controversé [150-153]. Etant donné qu'augmenter le cholestérol membranaire induit une augmentation de la production du peptide Aβ, il serait intéressant de savoir si cette augmentation joue sur l'homodimérisation de BACE1 ou d'APP. L'homodimérisation de protéines peut être suivie par hétéroFRET comme vu précédemment mais elle peut également être étudiée par homoFRET grâce à l'anisotropie de fluorescence résolue en temps comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

Chapitre IV : Anisotropie de fluorescence

Lorsque l'on s'intéresse à l'homodimérisation de protéines (c'est-à-dire à l'interaction entre deux protéines identiques), la technique de FRET classique qui requiert deux marquages est limitée. En effet, avec cette méthode, on obtiendra les dimères suivants, Donneur (D) +Accepteur (A), A+D, D+A, D+D et A+A, mais on ne pourra observer du FRET que pour la moitié des dimères, nommément les dimères A+D et D+A.

Une technique beaucoup plus élégante pour sonder l'homodimérisation consiste à faire de « l'homoFRET » qui ne nécessite qu'un seul marquage, facilitant notamment les conditions d'expression. Une des méthodes pour détecter l'homoFRET est d'avoir recours à l'anisotropie de fluorescence résolue en temps. Dans ce chapitre, nous présenterons cette technique puis nous verrons comment elle a été implémentée sur notre microscope TIRFLIM et mise en pratique pour suivre des interactions entre protéines.

1 Anisotropie de fluorescence résolue en temps (tr-FAIM)

1.1 Principe de l'anisotropie de fluorescence

1.1.1 Théorie

L'anisotropie de fluorescence est la mesure de la dépolarisation de la fluorescence. Elle repose sur le principe que lorsque l'on excite un fluorophore avec de la lumière polarisée, sa fluorescence va également être polarisée. Elle sera non nulle lorsqu'une direction d'émission sera privilégiée, sinon on parlera d'émission isotrope (c'est-à-dire identique dans toutes les directions). Un fluorophore peut être modélisé par un dipôle, comportant une composante d'absorption et une composante d'émission [1], [61]. Lorsque l'on excite un fluorophore avec de la lumière polarisée linéairement, l'anisotropie de fluorescence notée *r* sera définie par :

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \tag{4.1}$$

où $I_{//}$ et $I_{\perp}$ sont les intensités d'émission de fluorescence dont la polarisation est parallèle et perpendiculaire, respectivement, à la direction de la polarisation d'excitation. L'anisotropie de fluorescence est donc le rapport de la différence d'intensité entre les deux voies de détection parallèle et perpendiculaire à l'excitation sur l'intensité totale. Si l'on considère par exemple, une excitation avec une polarisation linéaire suivant l'axe *z*, on a $I_{//} = I_Z$ et $I_{\perp} = I_X = I_Y$ étant donné que l'émission dipolaire est symétrique orthogonalement à l'axe *z*, l'anisotropie sera alors définie par la relation :

$$r = \frac{I_Z - I_Y}{I_X + I_Y + I_Z} \tag{4.2}$$

Dans un premier temps, considérons une molécule unique dont les dipôles d'absorption et d'émission sont parallèles. On la considère immobile. Soit θ l'angle que forme cette molécule avec l'axe *z* dans le plan et Φ l'angle qu'elle forme par rapport à l'axe *x* dans le plan (*x*, *y*).

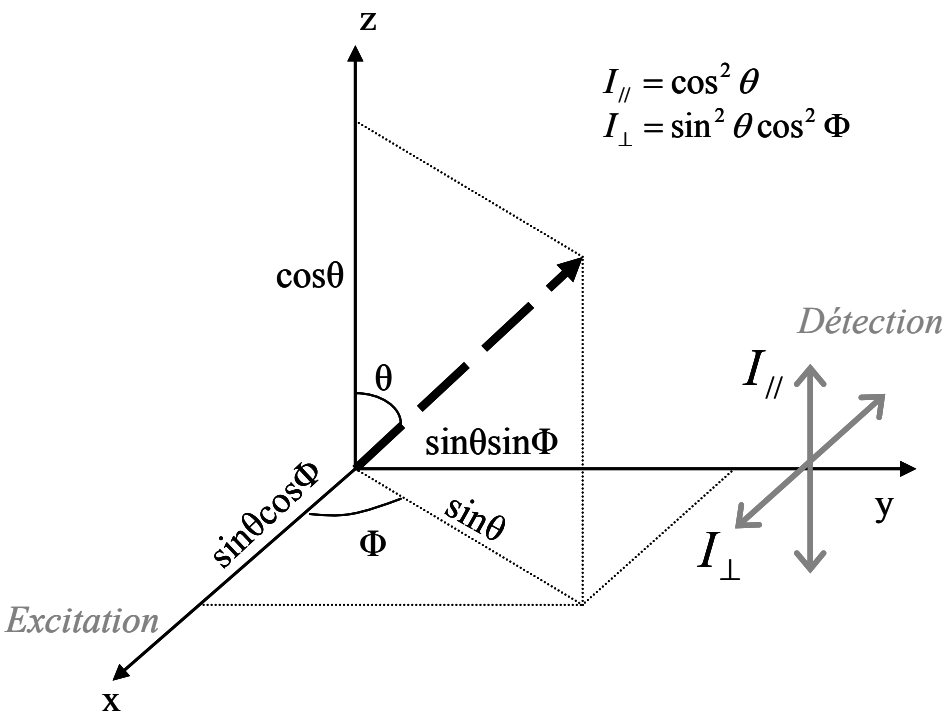


Fig. 4.1 : Intensités parallèle et perpendiculaire à la polarisation d'excitation d'un dipôle considéré comme molécule unique.

Cette molécule fluorescente se comporte comme un dipôle. L'intensité de la lumière émise est donc proportionnelle au carré de la projection du vecteur sur l'axe d'observation ou de détection. D'après la figure 4.1, on en déduit :

$$I_{//}(\theta,\Phi) = \cos^2\theta \tag{4.3}$$

$$I_{\perp}(\theta,\Phi) = \sin^2\theta\cos^2\Phi \tag{4.4}$$

Or l'excitation étant dirigée suivant *z* et les molécules étant réparties aléatoirement, on excite tous les fluorophores qui forment un angle Φ avec l'axe *x* avec la même efficacité. Ainsi la probabilité d'excitation des fluorophores est indépendante de Φ. En considérant que Φ varie entre 0 et 2π avec la même probabilité, on a :

$$I_{\perp}(\theta) = \sin^2\theta\langle\cos^2\Phi\rangle \tag{4.5}$$

$$\text{Avec } \langle\cos^2\Phi\rangle = \frac{\int_0^{2\pi}\cos^2\Phi d\Phi}{\int_0^{2\pi}d\Phi} = \frac{1}{2} \tag{4.6}$$

On en déduit donc :

$$I_{//}(\theta) = \cos^2\theta \tag{4.7}$$

$$I_{\perp}(\theta) = \frac{1}{2}\sin^2\theta \tag{4.8}$$

Si l'on considère désormais que l'on collecte les molécules orientées par rapport à l'axe *z* avec une probabilité $f(\theta)$, on obtient alors :

$$I_{//} = \int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)\cos^2\theta d\theta = k\langle\cos^2\theta\rangle_f \tag{4.9}$$

$$I_{\perp} = \frac{1}{2}\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)\sin^2\theta d\theta = \frac{k}{2}\langle\sin^2\theta\rangle_f \tag{4.10}$$

avec $\langle \cos^2\theta \rangle_f = \dfrac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)\cos^2\theta d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)d\theta}$, $\langle \sin^2\theta \rangle_f = \dfrac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)\sin^2\theta d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)d\theta}$ et k représente une constante expérimentale. D'après les définitions précédentes, la relation (4.1) devient :

$$r = \frac{3\langle \cos^2\theta \rangle_f - 1}{2} \tag{4.11}$$

D'après l'expression précédente, l'anisotropie de fluorescence dépend de la valeur moyenne du cosinus de l'angle formé entre la direction d'émission du dipôle et l'axe d'excitation (axe z). On constate ainsi que pour une molécule unique orientée selon l'axe d'excitation (soit $\theta = 0$) et dont les dipôles d'absorption et d'émission sont colinéaires, on obtient une anisotropie égale à 1. C'est l'anisotropie maximale que l'on peut atteindre en théorie, en ne prenant pas en compte la photosélection à l'excitation (que nous détaillerons par la suite) et avec les hypothèses précédentes.

On remarque par ailleurs avec la relation (4.11), que l'anisotropie résultante sera nulle pour $\cos^2\theta = \frac{1}{3}$. Cela se traduit par une valeur caractéristique de θ égale à 54,7°, qui correspond à l'angle de détection pour lequel on s'affranchit de toute polarisation résiduelle et qui est communément appelé « angle magique » [1]. Ainsi en détectant à l'angle magique par rapport à la polarisation d'excitation, on effectue une mesure proportionnelle à l'intensité totale, indépendante de la polarisation d'émision de fluorescence.

Après cette approche théorique, il faut désormais prendre en compte d'une part la photosélection à l'excitation et d'autre part le fait que les moments d'absorption et d'émission des dipôles sont rarement colinéaires.

1.1.2 Prise en compte de la photosélection des molécules à l'excitation et de l'orientation des dipôles d'absorption et d'émission

Lorsque l'on excite des molécules avec de la lumière polarisée linéairement (c'est-à-dire que la direction de son champ électrique est invariable), les molécules dont le dipôle d'absorption est orienté de façon parallèle au champ électrique vont être préférentiellement excitées alors que les molécules dont le dipôle d'absorption est orthogonal à l'orientation du champ électrique ne le seront jamais. Il n'est pas nécessaire que les molécules aient leur moment dipolaire parfaitement parallèle à l'excitation (selon axe z) pour être excitées. θ étant l'angle formé entre le champ électrique de la lumière polarisée linéairement et le dipôle d'absorption du fluorophore, la probabilité que le fluorophore absorbe un photon est proportionnelle à $\cos^2\theta$, et est appelée photosélection [61]. Ainsi tous les fluorophores formant le même angle θ entre leur dipôle d'absorption et le champ électrique auront la même probabilité d'être excités. Ceux-ci décrivent un cercle dont le rayon est proportionnel à $\sin\theta$ (Fig.4.1) [154]. Ainsi la portion de fluorophores susceptibles d'être excitée par une lumière linéairement polarisée (définie par θ) est proportionnelle à :

$$f(\theta) = \sin\theta\cos^2\theta \tag{4.12}$$

En considérant toujours des dipôles d'absorption et d'émission colinéaires, on déduit d'après la relation précédente :

$$\langle \cos^2\theta \rangle_f = \frac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2(\theta) f(\theta) d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta)d\theta} = \frac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^4(\theta)\sin(\theta) d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2(\theta)\sin(\theta) d\theta} = \frac{3}{5} \tag{4.13}$$

D'après la relation précédente et la relation (4.11), on en déduit $r_{max} = 0{,}4$, lorsque les dipôles d'absorption et d'émission du fluorophore sont parallèles. En prenant en compte la photosélection à

l'excitation, on réduit l'anisotropie maximale de 1 à 0,4, en considérant que les dipôles d'absorption et d'émission sont parallèles et qu'il n'y a pas de phénomènes de dépolarisation.

Si nous considérons désormais que les dipôles d'absorption et d'émission de la molécule ne sont pas colinéaires, l'anisotropie initiale r_0 ne sera pas maximale (égale à 2/5) et sera réduite d'un facteur lié à l'écart angulaire entre ses dipôles d'absorption et d'émission. D'après l'équation (4.11), nous avons vu que l'anisotropie d'une molécule formant un angle θ par rapport à la polarisation d'excitation valait $\frac{3\langle\cos^2\theta\rangle_f - 1}{2}$. Par un raisonnement analogue, nous en déduisons que l'anisotropie initiale d'une molécule dont les dipôles d'absorption et d'émission forment un angle β sera donnée par la relation suivante :

$$r_0 = \frac{2}{5}\left(\frac{3\langle\cos^2\beta\rangle_f - 1}{2}\right) \tag{4.14}$$

On constate ainsi que l'anisotropie initiale d'un fluorophore dépendra de la photosélection et de l'orientation angulaire de ses dipôles d'absorption et d'émission.

1.2 Anisotropie de fluorescence résolue en temps

L'anisotropie de fluorescence résolue en temps est donnée par la relation :

$$r(t) = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{//}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I_T(t)} \tag{4.15}$$

où $I_{//}(t)$ et $I_{\perp}(t)$ sont les déclins d'intensité dont la polarisation est parallèle et perpendiculaire par rapport à la polarisation de l'excitation pulsée, respectivement. Le dénominateur, comme vu précédemment, correspond à l'intensité totale et peut être déterminé simplement en plaçant un polariseur à la détection orienté à 54,7° (angle magique) par rapport à la polarisation de l'excitation. Cette mesure d'anisotropie de fluorescence résolue en temps va renseigner sur la dépolarisation de la lumière au cours du temps. L'intensité parallèle par rapport à la polarisation de l'excitation va décroître plus rapidement que l'intensité détectée sur la voie perpendiculaire. Ces intensités sont données par les relations suivantes :

$$I_{//}(t) = \frac{1}{3} I(t) \times [1 + 2r(t)] \tag{4.16}$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{1}{3} I(t) \times [1 - r(t)] \tag{4.17}$$

1.3 Applications du tr-FAIM

L'anisotropie de fluorescence va renseigner sur la dépolarisation de la fluorescence, qui peut être liée à différents facteurs. Comme nous l'avons vu précédemment, si les dipôles d'absorption et d'émission du fluorophore ne sont pas parallèles, cela induira une dépolarisation. Les deux autres principales origines de la dépolarisation sont le mouvement rotationnel des fluorophores ou le transfert non radiatif de l'énergie d'une molécule à une autre ayant une orientation différente. Ces mesures renseigneront ainsi sur la mobilité des fluorophores, leur taille, la fluidité du milieu, les interactions entre molécules, etc…

1.3.1 Mesure de la diffusion rotationnelle des molécules

Après avoir été photoselectionnées, par excitation laser, les molécules peuvent tourner par mouvements browniens et vont ainsi perdre leur orientation initiale (Fig.4.2). Ceci est la première cause de dépolarisation.

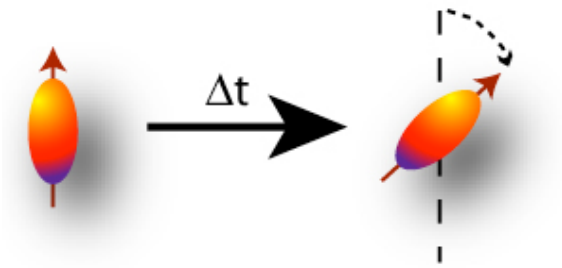


Fig. 4.2. Dépolarisation de la fluorescence par mouvement rotationnel du fluorophore [154].

En considérant une molécule sphérique, l'anisotropie de fluorescence va décroître de façon exponentielle avec le temps selon la relation :

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)\exp\left(-\frac{t}{\theta_{rot}}\right) + r_\infty \tag{4.18}$$

où r_0 est l'anisotropie initiale précédemment définie par la relation (4.14), qui ne dépend que des caractéristiques intrinsèques de la molécule. Dans le cas où les dipôles d'absorption et d'émission de la molécule sont parallèles, l'anisotropie initiale sera maximale et égale à 0,4. Dans l'expression (4.18), θ_{rot} représente le temps de corrélation rotationnelle et r_∞ l'anisotropie résiduelle dans le cas où la rotation de la molécule est contrainte. Considérons une population de molécules sphériques réparties de manière isotrope et dont la rotation n'est pas entravée. L'anisotropie mesurée directement après la photoselection (à $t = 0$) sera r_0 puis elle va diminuer avec le temps jusqu'à atteindre une valeur nulle. Si r_∞ est nulle, la molécule ne subit aucune contrainte pouvant empêcher sa rotation. θ_{rot} est ainsi un indicateur du temps de rotation de la molécule : plus θ_{rot} sera petit, plus la molécule tournera rapidement. θ_{rot} renseigne donc sur l'environnement du fluorophore et notamment sur la viscosité de celui-ci via la relation de Stokes-Einstein :

$$\theta_{rot} = \frac{4\pi a^3 \nu}{3kT} \tag{4.19}$$

où υ est la viscosité du milieu, a le rayon hydrodynamique de la molécule, k la constante de Boltzmann et T la température. Plus la solution sera visqueuse, plus la rotation de la molécule sera longue, ce qui induira une augmentation du temps de corrélation rotationnelle. Cela signifie qu'il faudra plus de temps pour que l'anisotropie diminue. Ainsi en mesurant le temps de diffusion rotationnelle des molécules, la viscosité de l'environnement peut être sondée [30], [155], [156].

Même si la mesure d'anisotropie de fluorescence est une technique puissante pour mesurer la rotation de molécules, certains obstacles peuvent entraver cette mesure [154]. Tout d'abord la durée de vie τ du fluorophore (temps moyen pendant lequel le fluorophore est à l'état excité) est une contrainte qu'il ne faut pas négliger, de même que la résolution temporelle du dispositif d'anisotropie. La limite basse de 10 ps est instrumentale et liée au système de détection FLIM alors que la limite haute entre 5τ et 10τ est intrinsèque au fluorophore. Par ailleurs, dans les expériences de biologie, lorsque l'on s'intéresse au mouvement rotationnel d'une molécule, celle-ci est souvent liée à un fluorophore par un *linker*. Par conséquent, on va suivre la rotation du fluorophore, qui nous renseigne sur la rotation de la molécule si ces deux entités sont liées de manière rigide. Dans le cas contraire, les déclins d'anisotropie de fluorescence rendront compte du mouvement du fluorophore contraint par la flexibilité de l'attache et par la taille et la forme de la molécule qui y est attachée. De plus, dans le cas où la molécule n'est pas considérée comme étant sphérique, le déclin d'anisotropie sera multi-exponentiel et donc beaucoup plus complexe à analyser en raison de la présence de nombreux paramètres [61]. C'est pourquoi dans la suite de cette étude, nous considérerons en première approximation que les molécules d'intérêt sont sphériques.

1.3.2 Suivi de l'interaction entre molécules (homoFRET)

L'anisotropie de fluorescence permet également d'étudier l'interaction entre deux molécules par homoFRET [154], [157]. Comme nous l'avons vu dans l'introduction et dans le chapitre III de façon appliquée, l'hétéroFRET se traduit entre autres par des changements d'intensité et de durée de vie de fluorescence du donneur et de l'accepteur que l'on peut détecter. En revanche, l'homoFRET ne va pas induire de modifications de l'intensité ou de la durée de vie de fluorescence du fluorophore. Pour mettre en évidence ce transfert, il faut recourir à la mesure de l'anisotropie de fluorescence. Cette technique permettra de détecter une dépolarisation de l'émission de fluorescence, liée au transfert d'énergie des molécules photoselectionnées (donneur) à d'autres molécules orientées aléatoirement (accepteur) (Fig.4.3).

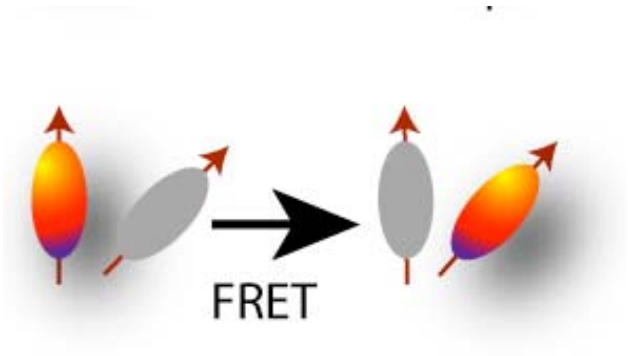


Fig.4.3. Dépolarisation de la fluorescence par transfert non radiatif d'énergie (homoFRET). Un fluorophore ayant été photoselectionné par une lumière linéairement polarisée, peut transférer son énergie de manière non radiative à un autre fluorophore à proximité (1-10 nm). Celui-ci possédant une orientation différente par rapport à la photosélection initiale va induire une dépolarisation de la lumière émise [154].

En choisissant des sondes dont la durée de vie de fluorescence τ est petite devant leur temps de corrélation rotationnelle (ex : GFP, $\tau = 2{,}4$ ns [27], [61], 10 ns$<\theta_{rot}<$ 23 ns, [158], [159]), nous pourrons différencier le transfert d'énergie par homoFRET très rapide, de la rotation de la GFP qui se fera avec un temps plus long. Un modèle d'ajustement biexponentiel sera alors utilisé [158] :

$$r(t) = r_0\left[b\exp\left(-\frac{t}{\phi_1}\right) + (1-b)\exp\left(-\frac{t}{\phi_2}\right)\right] \tag{4.20}$$

où ϕ_1 représente un temps de depolarisation très court qui rend compte du transfert d'énergie par homoFRET et ϕ_2 correspond au temps de corrélation rotationnelle de la molécule. b est la fraction de molécules en interaction. Cette technique permet ainsi de suivre l'homodimérisation de protéines en présence ou en absence de certains ligands [160-163].

La méthode d'anisotropie de fluorescence ainsi que les principales causes de dépolarisation ayant été introduites, nous allons maintenant nous intéresser à la mise en place de cette technique et voir tout d'abord quels sont les facteurs correctifs à prendre en compte étant donné notre configuration expérimentale.

1.4 Facteurs correctifs

Différents facteurs instrumentaux peuvent induire des dépolarisations que nous allons chercher à évaluer dans la partie qui suit. Nous allons ainsi introduire le facteur G et le facteur x_{ON} qui corrige de la dépolarisation induite par notre objectif à grande ouverture numérique (ON).

1.4.1 Facteur *G*

Tout d'abord, les différences des efficacités de transmission des intensités parallèle et perpendiculaire à la polarisation de l'excitation doivent être prises en compte. Elles sont regroupées dans le facteur *G* défini par la relation suivante :

$$G = \frac{I_{//}}{I_{\perp}} \tag{4.21}$$

La relation (4.1) devient alors :

$$r = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}} \tag{4.22}$$

où $I_{//}$ et $I_{\perp}$ représentent les intensités parallèle et perpendiculaire respectivement à la polarisation de l'excitation, en les ayant préalablement corrigées du bruit.

1.4.2 Facteur x_{ON}

L'utilisation d'objectifs avec de grandes ouvertures numériques doit également être prise en compte car cela va induire un facteur de dépolarisation supplémentaire [164]. En effet, lors des mesures d'anisotropie de fluorescence, on suppose que les faisceaux lumineux constituant le faisceau polarisé d'excitation sont parallèles entre eux et orthogonaux à la surface du filtre polariseur. Cependant, dans un microscope, lorsque les faisceaux polarisés sont focalisés par des objectifs à grande ouverture numérique, l'approximation scalaire n'est plus valable et le parallélisme des rayons est alors perdu. Ainsi la polarisation initialement linéaire de ces faisceaux est transformée en une polarisation elliptique du fait de l'ajout de nouvelles composantes vectorielles liées à la grande ouverture numérique [154], [165-167].

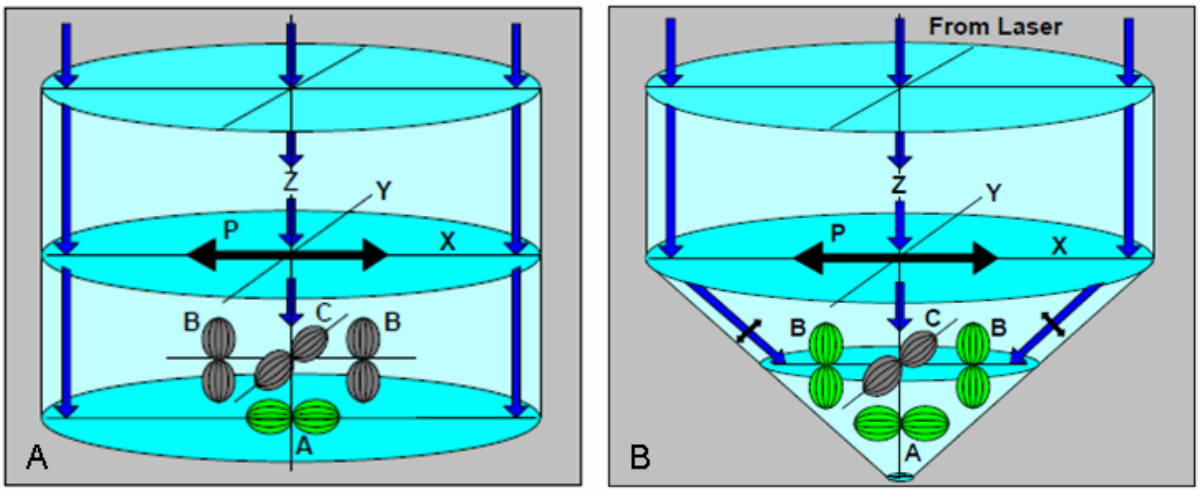


Fig.4.4 : Schéma de la photoselection à l'excitation avec une lumière linéairement polarisée suivant l'axe x en plein champ (A) et avec un faisceau convergent (B). Les dipôles d'absorption des fluorophores sont représentés. Ceux en vert correspondent aux fluorophores qui ont été photoselectionnés [165].

Si nous considérons une configuration où l'excitation et la détection se font en plein champ (Fig.4.4.A et Fig.4.5.A) et que les dipôles d'absorption et d'émission des molécules étudiées sont parallèles, en excitant les molécules en plein champ avec une lumière linéairement polarisée suivant *x*, on va photosélectionner les molécules orientées suivant l'axe *x* (molécules de type A, Fig.4.4.A). A la détection, on récupérera un signal de fluorescence dans les directions parallèle et orthogonale par rapport à la polarisation de l'excitation soit dans le plan (*x*, *y*), ce qui correspond aux molécules de type A et C sur la figure 4.5.A. En revanche, si l'on excite notre échantillon avec un faisceau convergent, en raison de la forte ouverture numérique, on ne va pas uniquement exciter les molécules

orientées parallèlement à la polarisation de l'excitation (molécules de type A, Fig.4.4.B), mais également des molécules orientées selon *z* (molécules de type B, Fig.4.4.B).

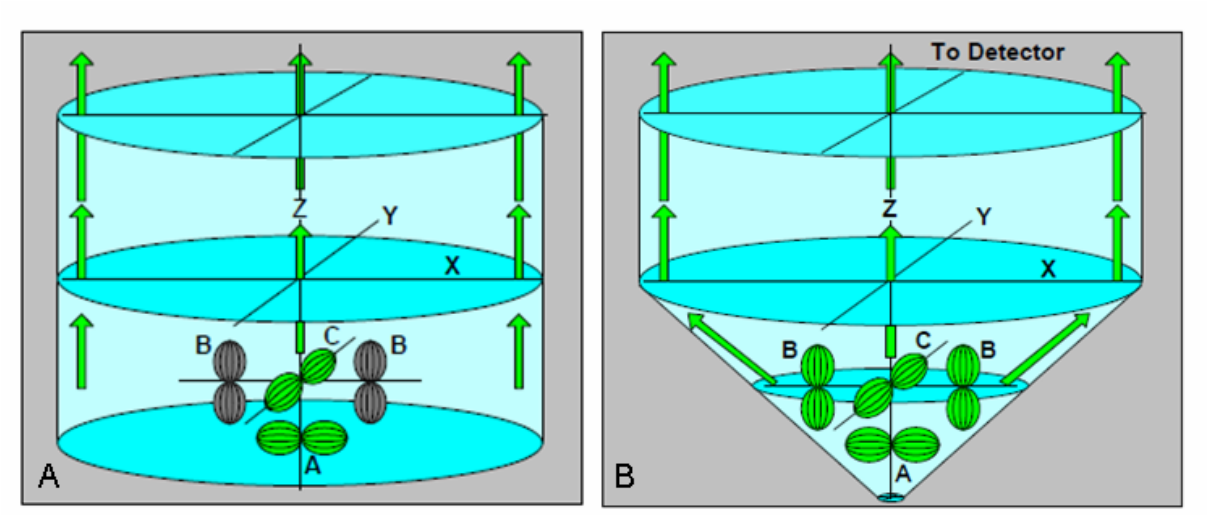


Fig.4.5 : Schéma de la détection de la fluorescence de molécules en plein champ (A) et avec un faisceau convergent (B). Les dipôles d'absorption des fluorophores sont représentés. Ceux en vert correspondent aux fluorophores qui seront détectés [165].

Dans notre cas, étant donné que nous réalisons une excitation en plein champ, nous n'induisons pas de dépolarisation supplémentaire à l'excitation. La dépolarisation aura lieu à la détection lors de la collection (qui est assimilable au cas d'un faisceau convergent Fig.4.5.B). Notre objectif va ainsi se comporter comme une sphère intégrante, nous collecterons donc de la fluorescence de composantes que nous ne devrions pas détecter.

Si l'on utilise des objectifs dont l'ouverture numérique est inférieure ou égale à 0,3 (approximation scalaire), ils n'induiront pas de dépolarisation supplémentaire ainsi, en considérant un facteur *G* valant 1, l'intensité totale sera bien donnée par la somme de la composante parallèle et des deux composantes perpendiculaires à la polarisation de l'excitation. En revanche, si l'on utilise des objectifs avec une grande ouverture numérique (> 0,3), il y aura une redistribution des intensités de fluorescence pour les deux polarisations. Le facteur x_{ON} directement lié à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé [166-168], rend compte de cette redistribution. Ainsi l'anisotropie de fluorescence sera donnée par la relation :

$$r(t) = \frac{I_{//}(t) - GI_{\perp}(t)}{I_{//}(t) + x_{ON}GI_{\perp}(t)} \tag{4.23}$$

Pour les objectifs à faible ouverture numérique (ON ≤ 0,3), x_{ON} sera égal à 2. Pour les objectifs dont l'ouverture numérique est supérieure à 0,3, nous verrons par la suite comment déterminer expérimentalement ce facteur correctif x_{ON}.

2 Mise en place et calibration du dispositif tr-FAIM

2.1 Dispositif expérimental

2.1.1 Polarisation de l'excitation

Le montage tr-FAIM (*time-resolved Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy*) a été implémenté sur le microscope TIRFLIM, que nous avons adapté pour qu'il soit résolu en polarisation en plus de la résolution temporelle.

Pour cela, il a d'abord fallu polariser notre faisceau à l'excitation, étant donné que notre laser supercontinuum SC400 n'est pas polarisé. Nous avons utilisé un polariseur (*Glan Laser Calcite Polarizer* avec un revêtement dans le visible, 350-700 nm, *Thorlabs*) qui nous permet d'obtenir une polarisation linéaire en sortie de ce dernier. Il est composé de deux prismes en calcite (matériau biréfringent), séparés par une fine couche d'air le long de leur plus grand côté. Ces prismes sont taillés de telle sorte que le faisceau incident arrive à l'angle de Brewster sur la couche d'air pour que la polarisation *p* ne soit pas réfléchie. Ainsi, pour un faisceau incident, normal à la surface du prisme, la polarisation *s* sera réfléchie et la polarisation *p* sera transmise (Annexe IV.1, Fig.4.1.1). Une lame demi-onde a été ajoutée après le polariseur de façon à pouvoir modifier la polarisation (*p* ou *s*).

2.1.2 Détection résolue en polarisation

Pour pouvoir effectuer une détection résolue en polarisation, un imageur résolu en polarisation a été inséré sur la voie de détection résolue en temps FLIM. Il s'agit d'un dispositif commercial *Dual View/Optosplit*, développé par la société *Cairn Research* pour faire de l'imagerie résolue spectralement ou en polarisation. Suivant l'application que l'on souhaite, on peut insérer dans le *Dual View* (DV) un cube comportant un dichroïque et des filtres adaptés aux longueurs d'onde d'intérêt ou bien un cube séparateur de polarisation. Le DV est composé de deux lentilles de focalisation en entrée et en sortie du dispositif. Des miroirs de renvoi permettent de contrôler et d'optimiser le réglage du faisceau pour les deux voies séparées spectralement (Fig.4.6) ou en polarisation. L'ouverture du DV est rectangulaire et ajustable par l'utilisateur, qui peut adapter sa zone d'intérêt en fonction de son application. Nous avons fixé le DV directement sur l'intensificateur, qui est lui-même couplé à la caméra CCD. Une bague d'adaptation en sortie du DV permet d'ajuster la focalisation afin de l'optimiser sur la caméra.

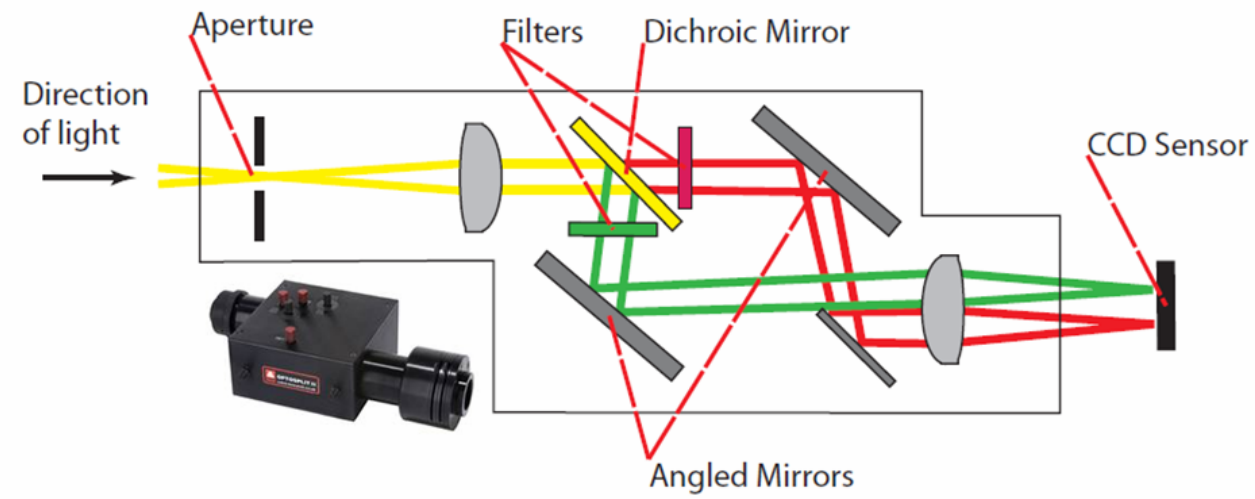


Fig.4.6 : Photographie et schéma du Dual View (Optosplit, Cairn) pour séparer une image spectralement (Optosplit II Manual).

Le cube polariseur du DV est optimisé dans la gamme de longueur d'onde 400-650 nm. Ses caractéristiques sont données dans l'Annexe IV.1 (Fig.4.1.2). Nous obtenons ainsi des images en

intensité pour les deux polarisations parallèle et perpendiculaire par rapport à la polarisation excitatrice. En tirant conjointement parti de la détection résolue en temps, nous pouvons acquérir une série d'images tout au long du déclin de fluorescence pour chacune des polarisations. A l'aide de cette série, en utilisant l'équation (4.23), nous en déduisons l'évolution de l'anisotropie au cours du temps. Pour nos acquisitions, nous avons utilisé 30 portes temporelles de 800 ps de largeur. Chaque porte correspond à une moyenne de 10 images. Le temps d'acquisition pour chaque porte temporelle est de 2,5 s. Pour l'obtention des déclins d'anisotropie de fluorescence, le nombre de portes est adapté en fonction du signal restant dans chacune des deux voies par rapport au bruit de fond.

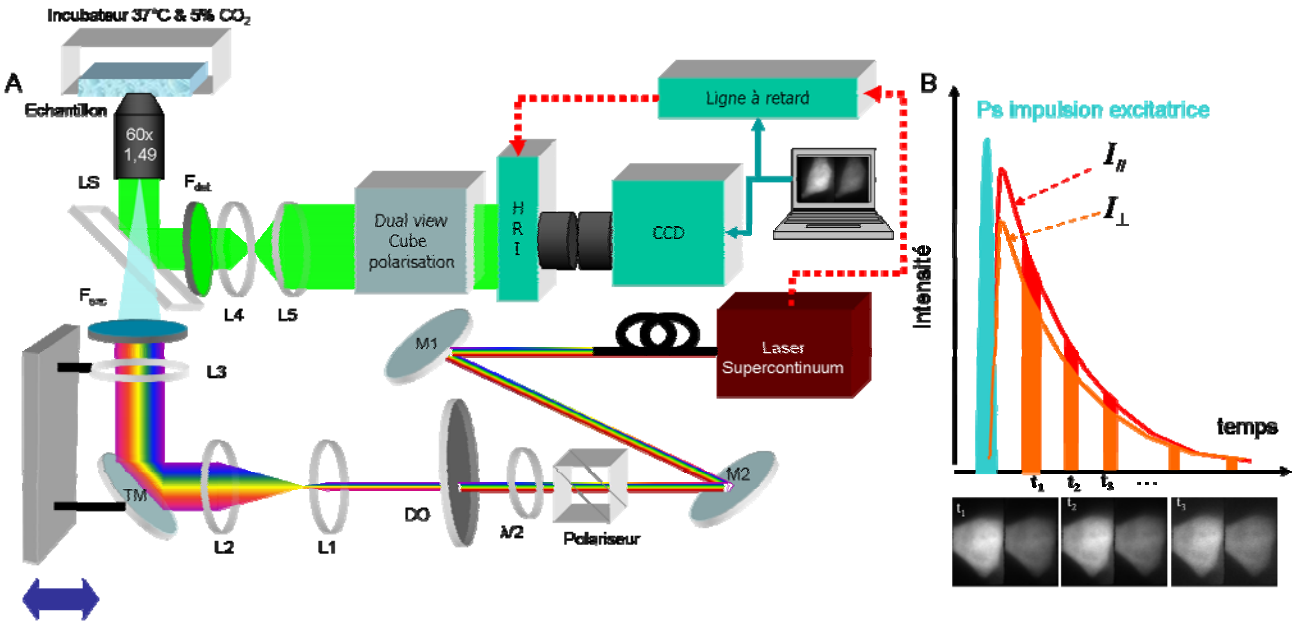


Fig.4.7 : Schéma du montage tr-FAIM
(A) M1&M2 : miroirs pour filtrer la composante IR du laser, DO : densité optique pour contrôler la puissance incidente du laser sur l'échantillon, L1&L2 : télescope pour élargir le faisceau par rapport au champ, F : filtre, L3 : Lentille pour focaliser le laser dans le plan focal arrière de l'objectif 60x, ON=1,49. TM : miroir monté sur une platine de translation pour changer d'une excitation en épifluorescence à une excitation en TIRF. LS : Lame séparatrice, HRI : High Rate Imager, CCD : Charge-coupled device camera.
(B) Représentation schématique des acquisitions obtenues avec notre montage tr-FAIM. Des portes temporelles sont ouvertes à différents temps après l'impulsion laser, ce qui se traduit par une série de portes temporelles pour chaque polarisation.

2.1.3 Traitement informatique

Grâce au programme développé sous *Labview* pour le FLIM couplé à notre dispositif tr-FAIM, nous pouvons acquérir une pile d'images au cours du déclin de fluorescence, qui contiennent les informations en polarisation. Nous avons utilisé un *plugin* développé par *ImageJ* et *Cairn* pour séparer ensuite les deux polarisations (*Cairn Image Splitter*). Pour obtenir une carte de la répartition de l'anisotropie moyenne par exemple, un autre programme développé sous *Labview* permet d'obtenir la pile d'images (16 bits) correspondant aux variations de l'anisotropie au cours du temps. Ce programme effectue un calcul de l'anisotropie point par point pour chaque porte temporelle (chaque image étant considérée comme un tableau). Le bruit, les facteurs G et x_{ON} sont des paramètres ajustables de ce programme. L'évolution de l'anisotropie moyenne tout au long du déclin est déduite de ces acquisitions et l'utilisation d'un ajustement mono-exponentiel (équation (4.18)) permet d'extraire les différents paramètres du déclin.

Nous pouvons aussi exploiter directement les déclins d'intensité moyenne pour chacune des polarisations. Grâce à l'équation (4.23), nous en déduisons directement la variation de l'anisotropie moyenne au cours du temps.

2.2 Validation du dispositif avec des solutions de fluorescéine de différentes viscosités

Afin de calibrer notre dispositif d'anisotropie de fluorescence résolue en temps et d'estimer si nous étions capables de mesurer des temps de corrélation rotationnelle de fluorophores et ainsi de remonter à la viscosité de leur environnement, nous avons choisi d'utiliser des solutions de fluorescéine avec différentes gammes de viscosité. Toutes ces mesures ont été effectuées en excitation en épifluorescence de polarisation *p*. Les mesures ont été faites avec le cube « GFP » (filtre à l'excitation : 472/30 nm, filtre à la détection 520/35 nm).

2.2.1 Gamme de viscosité

Quatre solutions de fluorescéine (*Fluorescein* 548 nm, MW = 401,20 g.mol^{-1}, *Exciton*) dans l'eau, dont la concentration était de 6 µM, ont ainsi été utilisées. Les pourcentages de glycérol de ces solutions étaient de 0%, 28-35%, 44-50% et 62-70%. Ces pourcentages ont été déterminés grâce à une mesure de l'indice de réfraction de ces différentes solutions à l'aide d'un réfractomètre (*Atago*, Japon). Les pourcentages de glycérol contenus dans ces solutions et les viscosités associées ont ensuite été déterminés en utilisant des tables reliant ces paramètres [169]. Les mesures ont été faites à 20 ± 2°C. Nous avons ensuite effectué des mesures d'anisotropie de fluorescence résolue en temps. Des mesures ont été réalisées sur l'ensemble de la gamme de solutions, quatre fois de manière indépendante.

2.2.2 Caractérisation des solutions de fluorescéine avec l'objectif 10x

Avec la solution de fluorescéine ne contenant pas de glycérol, nous avons déterminé le facteur G^{obj10} en calculant le rapport $\frac{I_{//}(t)}{I_{\perp}(t)}$. La superposition des déclins pour les deux polarisations (*tail-matching*) était bonne (Fig.4.8.A). Pour voir si G^{obj10} variait au cours du temps, nous avons mesuré sa valeur moyenne entre 400 ps après l'impulsion (pour ne pas avoir d'anisotropie de fluorescence résiduelle) et 8 ns après l'impulsion (limite haute avant d'être dans le bruit de fond), sachant que chaque mesure associée à une porte temporelle est déjà la moyenne de 10 acquisitions (mesures de répétabilité).

Nous avons ainsi obtenu une valeur moyenne de $G^{obj10}(t) = 1{,}047 \pm 0{,}006$. L'écart-type associé à cette moyenne temporelle est suffisamment bas (de l'ordre de 0,6%) pour considérer que G^{obj10} est indépendant du temps. En revanche, nous avons constaté que G^{obj10} variait en fonction de la position dans l'échantillon. Cela est lié notamment à l'écran à phosphore sur lequel la répartition en intensité n'est pas uniforme. Celle-ci présente une forme gaussienne avec une perte d'intensité lumineuse sur les bords de l'écran ce qui génère une sorte de « halo lumineux » au centre de l'écran. Pour avoir les variations de l'anisotropie de fluorescence en un point précis de l'échantillon, il faut utiliser le facteur correctif $G(x, y)$. En revanche, si l'on s'intéresse à l'évolution de l'anisotropie de fluorescence moyennée sur tout l'échantillon (en travaillant à l'aide des intensités moyennes pour chaque porte temporelle), on peut utiliser une valeur moyenne pour G^{obj10}. Dans ce cas, on aura $G^{obj10} = 1{,}05$.

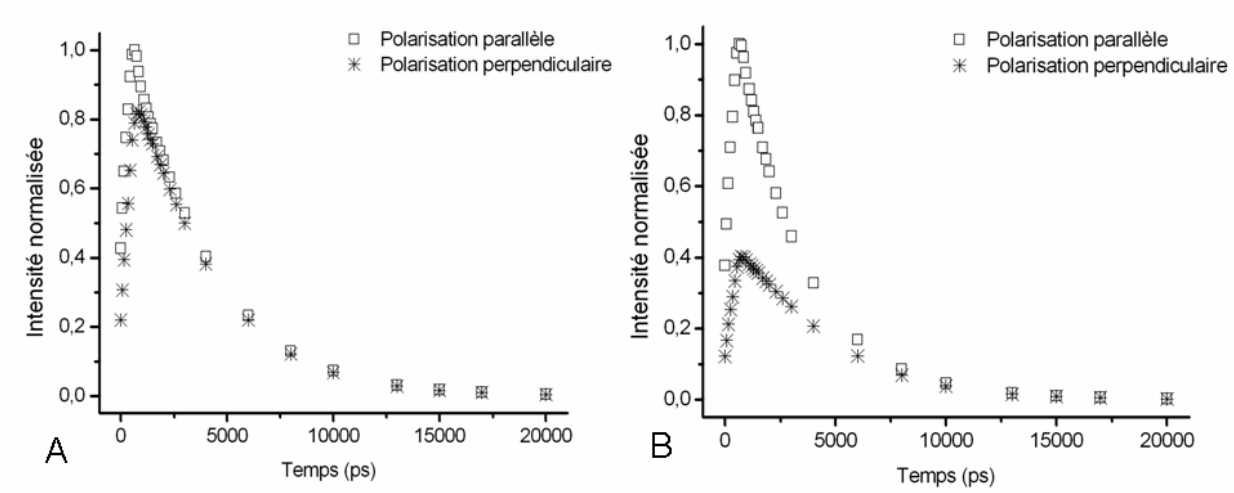


Fig.4.8 : Déclins d'intensité dont la polarisation est parallèle (□) ou perpendiculaire (✳) par rapport à la polarisation de l'excitation pour une solution de fluorescéine non visqueuse (absence de glycérol) (A) et dans le cas d'une solution très visqueuse contenant 70% de glycérol (B). Ces mesures ont été effectuées avec l'objectif 10x (ON=0,3).

Les figures 4.8.A&B montrent des exemples de déclins d'intensité obtenus pour deux types de solutions de fluorescéine : une solution non visqueuse (Fig.4.8.A) et une solution très visqueuse contenant environ 70% de glycérol (Fig.4.8.B). Dans le cas d'une solution non visqueuse, les déclins obtenus pour chacune des deux polarisations sont très proches et se superposent à la fin du déclin. L'écart entre les deux déclins rend seulement compte de la différence entre les efficacités de transmission des optiques pour ces deux polarisations. Pour une solution très visqueuse, l'écart entre les déclins associés aux deux polarisations est important, ce qui témoigne du fort caractère anisotrope de la solution (Fig.4.8.B). A l'aide des déclins d'intensité de fluorescence, nous avons déduit l'évolution de l'anisotropie au cours du temps en utilisant l'équation (4.23). Ces mesures ayant été réalisées avec un objectif 10x dont l'ouverture numérique est égale à 0,3, le facteur x_{ON} était égal à 2. Le déclin d'anisotropie obtenu a ensuite était ajusté avec un modèle de déclin mono-exponentiel (équation (4.18)), donnant le temps de corrélation rotationnelle θ_{rot} (Tab.4.1), r_0 et r_∞. Les temps de corrélation rotationnelle peuvent ensuite être utilisés pour déterminer la viscosité de l'environnement des molécules d'intérêt grâce à l'équation (4.19).

Pourcentage de glycérol (%)	**Viscosité de la solution de fluorescéine (cP)**	**Temps de correlation rotationnelle (ps) (moyenne ± e-t)**
0	1,005	261 ± 14
29	2,41	613 ± 8
34	2,92	571 ± 12
35	3,04	743 ± 22
45	4,715	1067 ± 10
63	13,43	2709 ± 41
66	16,73	3009 ± 58
70	22,94	3786 ± 88

Tab.4.1 : Temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine placée dans différentes viscosités. Les mesures ont été effectuées avec l'objectif 10x (ON = 0,3).

Pour vérifier l'exactitude de nos mesures, nous avons tracé l'évolution du temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine mesurée à l'aide de notre dispositif tr-FAIM, en fonction de la viscosité de l'environnement (Fig.4.9).

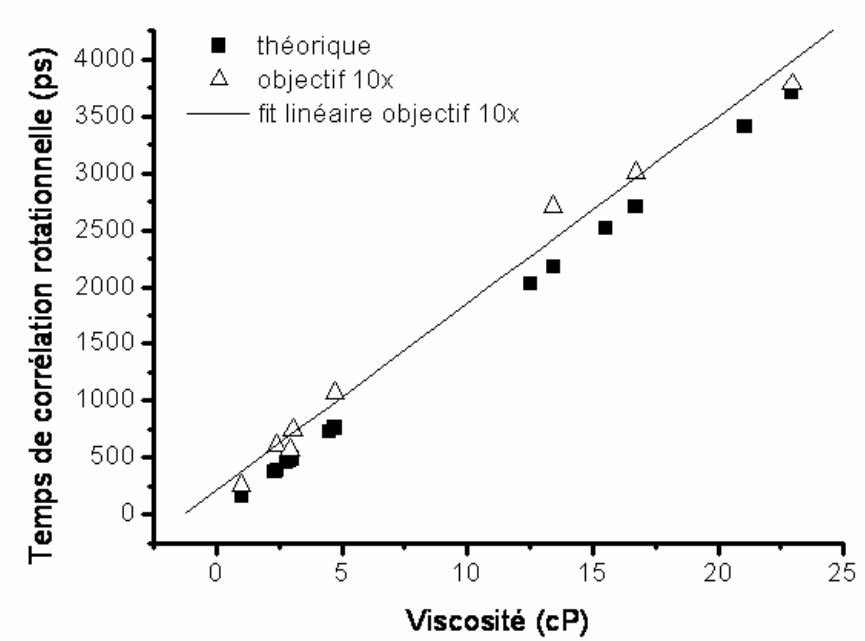


Fig.4.9: Variations du temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine en fonction de la viscosité de la solution. Les valeurs théoriques (■), les valeurs expérimentales obtenues avec l'objectif 10x (Δ) sont tracées.

Les valeurs expérimentales obtenues pour les temps de corrélation rotationnelle sont en accord avec les mesures théoriques calculées à l'aide de l'équation (4.19) et avec les mesures de viscosité faites avec le réfractomètre en considérant un rayon de 0,54 nm pour la fluorescéine [170]. En appliquant une régression linéaire à nos valeurs expérimentales, nous avons obtenu une pente de 161 ps/cP ($R^2 = 0,9947$). A l'aide de la relation de Stokes-Einstein (4.19), nous pouvons déduire le rayon expérimental hydrodynamique de la fluorescéine, soit 0,54 nm (en prenant $T = 295$K et $k = 1,38\times10^{-23}$ J.K^{-1},). Ces résultats sont en accord avec les valeurs théoriques ainsi qu'avec les résultats trouvés dans la littérature pour le même type de dispositif d'anisotropie de fluorescence [170]. Ces résultats montrent que nous pouvons, avec notre dispositif tr-FAIM, mesurer des temps de corrélation rotationnelle de molécules avec exactitude, ce qui est un moyen de sonder la viscosité de leur environnement.

De façon à pouvoir effectuer ce même type de mesure avec notre objectif à grande ouverture numérique, nous avons tout d'abord dû évaluer la dépolarisation induite par cet objectif, pour pouvoir corriger les mesures effectuées.

2.2.3 Détermination du facteur x_{ON}

Pour quantifier le coefficient de dépolarisation liée à la grande ouverture numérique de l'objectif, nous avons effectué des mesures d'anisotropie de fluorescence résolue en temps sur des solutions de fluorescéine en utilisant des objectifs de différentes ouvertures numériques. Nous avons ainsi utilisé un objectif 10x, ON = 0,3, un objectif 40x, ON = 1 et un objectif 60x, ON = 1,49. La figure 4.10 montre comment évolue l'anisotropie de fluorescence mesurée sur une solution de fluorescéine contenant 70% de glycérol, en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif.

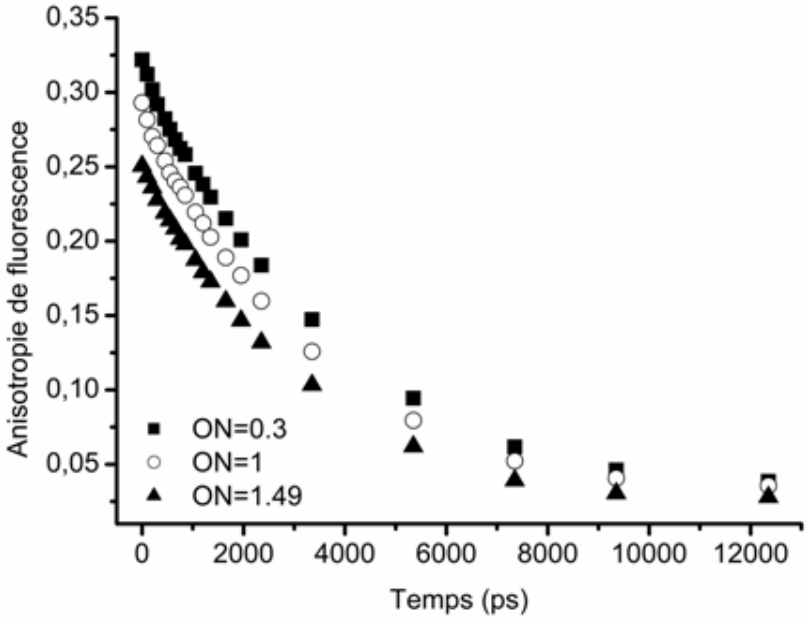


Fig.4.10: Variations au cours du temps de l'anisotropie de fluorescéine d'une solution de fluorescéine très visqueuse (70% de glycérol) pour les trois objectifs d'ouverture numérique différente.

On constate sur la figure 4.10, que l'anisotropie de fluorescence diminue avec l'augmentation de l'ouverture numérique de l'objectif. La valeur d'anisotropie initiale r_0 semble particulièrement affectée par les différences d'ouverture numérique, le temps de corrélation rotationnelle beaucoup moins. Pour corriger l'effet de cette dépolarisation, nous avons considéré les mesures faites avec l'objectif 10x comme étant les mesures de référence et nous avons corrigé les déclins d'anisotropie de fluorescence obtenus avec l'objectif 60x en conséquence à l'aide de la relation suivante :

$$x_{ON}(t) = \frac{I_{//}^{obj60}(t)(1 - r^{obj10}(t)) - G^{obj60} I_{\perp}^{obj60}(t)}{G^{obj60} r^{obj10}(t) I_{\perp}^{obj60}(t)} \tag{4.24}$$

où $I_{//}^{obj60}(t)$ et $I_{\perp}^{obj60}(t)$ représentent les intensités de fluorescence dont les polarisations sont respectivement parallèle et perpendiculaire à la polarisation de l'excitation, mesurées avec l'objectif 60x (bruit de fond soustrait). $r^{obj10}(t)$ correspond à l'anisotropie de fluorescence mesurée avec l'objectif 10x et G^{obj60} est le facteur G mesuré avec l'objectif 60x sur une solution de fluorescéine non visqueuse grâce à l'équation (4.21). Nous avons ainsi obtenu une variation pour $G^{obj60}(t) = 1{,}042 \pm 0{,}004$ (en partant 400 ps après l'impulsion et jusqu'à 8 ns après l'impulsion). L'écart-type sur cette mesure de G est très faible (de l'ordre de 0,4%), nous avons donc considéré par la suite (comme pour l'objectif 10x), que G^{obj60} était constant au cours du temps et égal à 1,04 (lorsque que nous travaillons avec les intensités moyennes pour les polarisations sinon il faut prendre $G(x, y)$ comme nous l'avons vu pour l'objectif 10x).

Pour déterminer x_{ON}, nous avons effectué des mesures d'anisotropie de fluorescence sur une solution de fluorescéine contenant 70% de glycérol en excitation en polarisation p. La figure 4.11 montre les variations de x_{ON} au cours du temps, Chaque valeur pour une porte temporelle donnée est la moyenne de 10 acquisitions effectuées sur la solution de fluorescéine précédente avec les objectifs 10x et 60x. La moyenne des variations de $x_{ON}(t)$ au cours du temps est stable autour d'une valeur de (1,21 ± 0,06). Cette valeur correspond à une correction de l'ordre de 61% avec une erreur relative de l'ordre de 5%, de la valeur initiale $x_{ON} = 2$ quand il n'y a pas de dépolarisation liée à la forte ouverture numérique de l'objectif.

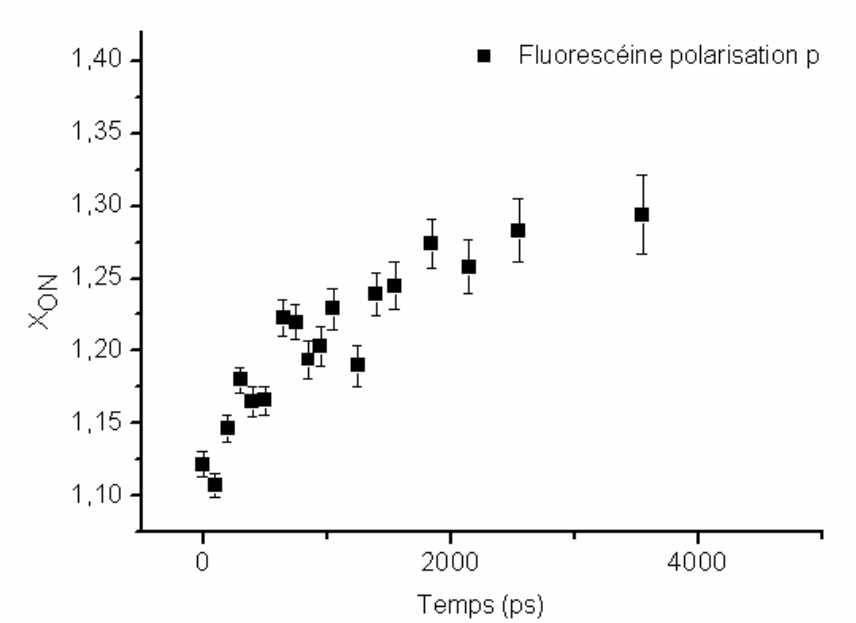


Fig.4.11 : Variations de x_{ON} au cours du temps en prenant en compte la dépolarisation de l'objectif 60x pour une solution de fluorescéine avec 70% de glycérol en excitation en polarisation p.

Ces résultats confirment le fait que la dépolarisation liée à la grande ouverture numérique de l'objectif aura un effet important sur les solutions les plus visqueuses. La valeur standard de 2 utilisée pour les objectifs à faible ouverture numérique ne pourra donc plus être utilisée dans ce cas. Nous avons essayé dans un premier temps de corriger la dépolarisation liée à la grande ouverture numérique de l'objectif pour chacune des portes temporelles du déclin et par conséquent de prendre en compte la variation temporelle de x_{ON}. Cependant, cela dégradait le déclin d'anisotropie de fluorescence obtenu qui perdait son comportement mono-exponentiel. La valeur moyenne de 1,2 pour x_{ON} a donc été utilisée pour calculer les anisotropies de fluorescence mesurées avec l'objectif 60x.

2.2.4 Variation du temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine en fonction de la viscosité de la solution pour l'objectif 60x.

Comme pour les mesures faites avec l'objectif 10x, nous avons mesuré le temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine à l'aide de notre dispositif tr-FAIM en prenant en compte la dépolarisation x_{ON} liée à l'objectif, en fonction de la viscosité de son environnement. Selon la théorie (équation (4.19)), cette variation devrait être linéaire. Les valeurs théoriques et expérimentales sont regroupées dans le tableau 4.2 et les variations du temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine en fonction de la viscosité de la solution sont présentées sur la figure 4.12.

Pourcentage de glycérol (%)	Viscosité de la solution de fluorescéine (cP)	Temps de corrélation rotationnelle (ps) (moyenne ± e-t)
0	1,005	226 ± 16
29	2,41	492 ± 7
34	2,92	529 ± 8
35	3,04	727 ± 24
45	4,715	885 ± 11
63	13,43	2466 ± 29
66	16,73	2812 ± 103
70	22,94	3642 ± 119

Tab.4.2 : Temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine placée dans des solutions de différentes viscosités. Les mesures ont été effectuées avec l'objectif 60x (ON = 1,49) et pour x_{ON} = 1,2.

Comme précédemment, les valeurs théoriques ont été calculées à l'aide des mesures effectuées avec le refractomètre et de la relation de Stokes-Einstein, en considérant un rayon de 0,54 nm pour la fluorescéine. Les mesures présentées (Fig. 4.12) sont le résultat de trois expériences indépendantes. La régression linéaire appliquée aux données expérimentales donne une pente de 158,05 ps/cP avec un bon coefficient de corrélation ($R^2 = 0,9932$). On en déduit un rayon hydrodynamique pour la fluorescéine de 0,54 nm. Cela est en accord avec les mesures faites avec l'objectif 10x et également avec la théorie [170].

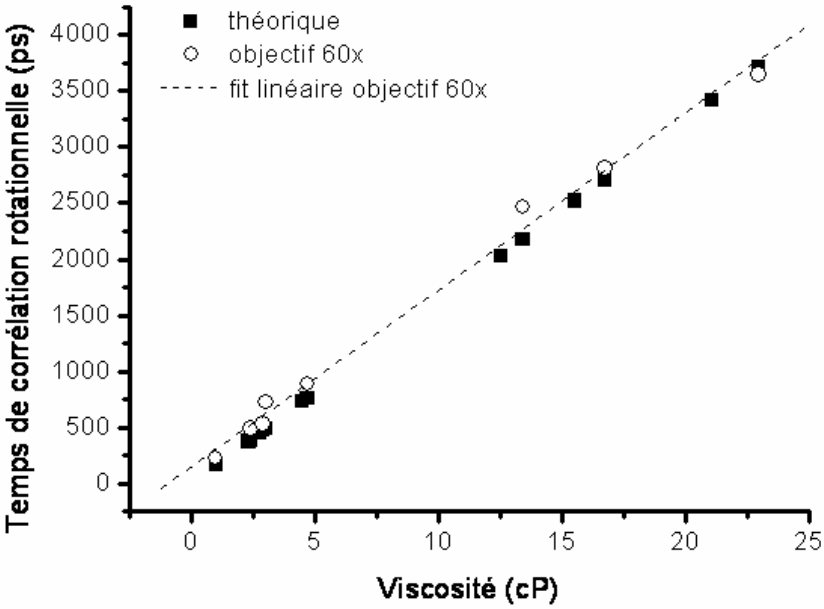


Fig.4.12: Variations du temps de corrélation rotationnelle de la fluorescéine en fonction de la viscosité de la solution. Les valeurs théoriques (■) et les valeurs expérimentales obtenues avec l'objectif 60x (○) sont tracées.

2.2.5 Vérification du rayon de la fluorescéine avec des mesures de FCS

Pour vérifier de façon indépendante la mesure du rayon de la fluorescéine, nous avons utilisé la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), méthode présentée dans le chapitre I. Des mesures ont été effectuées sur des solutions de fluorescéine de viscosités comprises dans les quatre gammes présentées précédemment mais avec des concentrations 100 fois plus faibles. Ces mesures ont été réalisées sur un microscope confocal SP5 (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Allemagne) avec une détection externe pour la FCS (*PicoQuant*, Berlin, Allemagne) [81]. A l'aide des mesures de FCS, nous pouvons déterminer le temps de diffusion de la fluorescéine τ_{diff}, qui est lié à la viscosité de l'environnement υ et au rayon hydrodynamique de la fluorescéine par la relation ci-dessous :

$$r_h = \frac{kT}{6\pi D \nu} \tag{4.25}$$

$$\text{avec } D = \frac{\omega_1^2}{4\tau_{diff}} \tag{4.26}$$

où ω_1 représente la largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle du système (PSF).
Le tableau 4.3 regroupe les temps de diffusion obtenus en fonction de la viscosité de la solution.

Pourcentage de glycérol (%)	Viscosité des solutions de fluorescéine (cP)	Temps de diffusion (ms)
0	1,005	0,06
25	2,095	0,18
51	6,396	0,3
74	28,96	0,94

Tab.4.3 : Temps de diffusion de la fluorescéine placée dans des solutions de différentes viscosités, obtenus par FCS.

La régression linéaire appliquée à la variation du temps de diffusion de la fluorescéine en fonction de la viscosité de l'environnement a donné une pente de 0,0298 Pa^{-1} (R^2 = 0,9898). Sur notre dispositif, ω_1 a été déduit de la mesure de réponse percusionnelle effectuée sur des billes de 100 nm de diamètre et valait 220 nm. D'après les équations (4.25) et (4.26), nous obtenons r_h = 0,53 nm. Ce résultat est donc en accord avec les mesures effectuées avec notre microscope tr-FAIM pour les deux objectifs 10x et 60x avec la correction x_{ON}.

Ainsi le recoupement de tous ces résultats montre que nous sommes capables avec notre dispositif d'anisotropie de fluorescence résolue en temps de mesurer des temps de corrélation rotationnelle avec des objectifs à faible et forte ouverture numérique.

2.3 Validation du dispositif sur cellules HEK-293 exprimant eGFP cytosolique ou un tandem eGFP-eGFP

Des mesures d'anisotropie de fluorescence ont été effectuées sur des cellules HEK-293 exprimant de façon transitoire l'eGFP cytosolique ou un tandem-eGFP cytosolique donné par JC. Mevel de l'Institut Jacques Monod, à Paris. L'eGFP cytosolique peut être monomérique ou dimérique. A l'inverse, le tandem-eGFP est un dimère constitutif et nous servira donc de contrôle positif pour l'homoFRET. Etant donné que ces deux constructions sont cytosoliques, seule une illumination en épifluorescence était possible.

2.3.1 Quantification du facteur x_{ON} en cellules HEK-293

Nous avons décidé d'évaluer le facteur correctif dû à la dépolarisation des objectifs à grande ouverture numérique en cellules pour le comparer aux mesures faites en solution. Nos applications biologiques impliquent de travailler avec des fluorophores confinés dans la membrane plasmique et dans le cytosol des cellules qui constituent des environnements très visqueux et hétérogènes [171]. Cette correction est nécessaire car comme en solution, les objectifs à grande ouverture numérique vont diminuer l'anisotropie mesurée (Fig. 4.13).

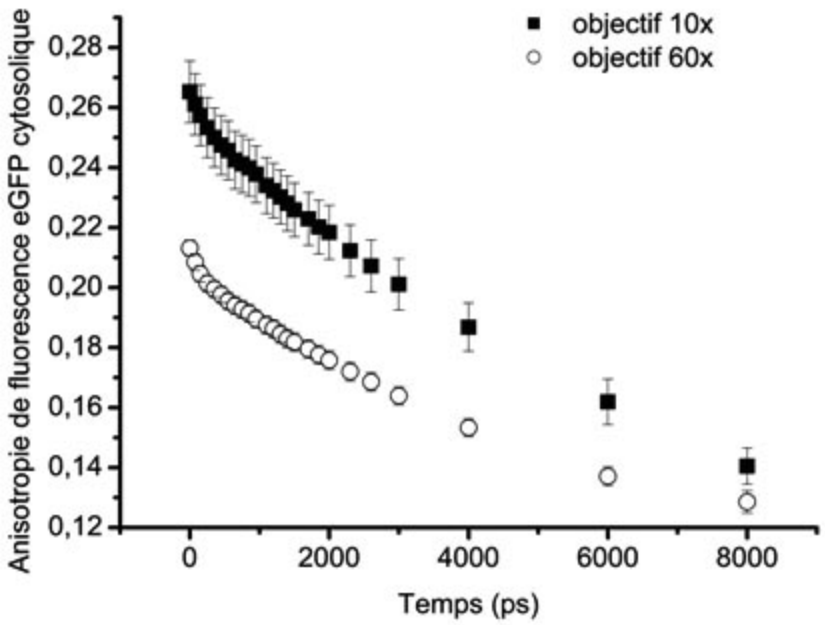


Fig.4.13: Variations au cours du temps de l'anisotropie de fluorescence moyenne de l'eGFP cytosolique exprimée en cellules HEK-293 et mesurée à l'aide de l'objectif 10x (■ , 60 cellules) et à l'aide de l'objectif 60x (○, 10 cellules). Pour ces mesures, le facteur x_{ON} était égal à 2.

Le facteur correctif a donc été évalué en cellules HEK-293 exprimant l'eGFP cytosolique en considérant, comme en solution, que les mesures effectuées avec l'objectif 10x sont nos références et en corrigeant les mesures faites avec l'objectif 60x par rapport à ces valeurs. Nous avons ainsi corrigé individuellement les déclins d'anisotropie de fluorescence obtenus sur chaque cellule avec l'objectif 60x, par rapport au déclin d'anisotropie de fluorescence moyenné sur environ 60 cellules obtenu avec l'objectif 10x. Une valeur moyenne de x_{ON} a été déterminée en moyennant pour chaque porte temporelle les valeurs corrigées individuellement. Sur la figure 4.14, les variations de x_{ON} au cours du temps dans le cas d'une correction en cellules (pour une excitation en polarisation *p*) sont tracées. Ces variations sont semblables à celles obtenues en corrigeant une solution de fluorescéine très visqueuse, ce qui rend compte de la viscosité du cytosol. Ces résultats sont en accord avec la littérature [171]. Le facteur x_{ON} égal à 1,2 utilisé pour les solutions a donc été conservé pour les mesures en cellules.

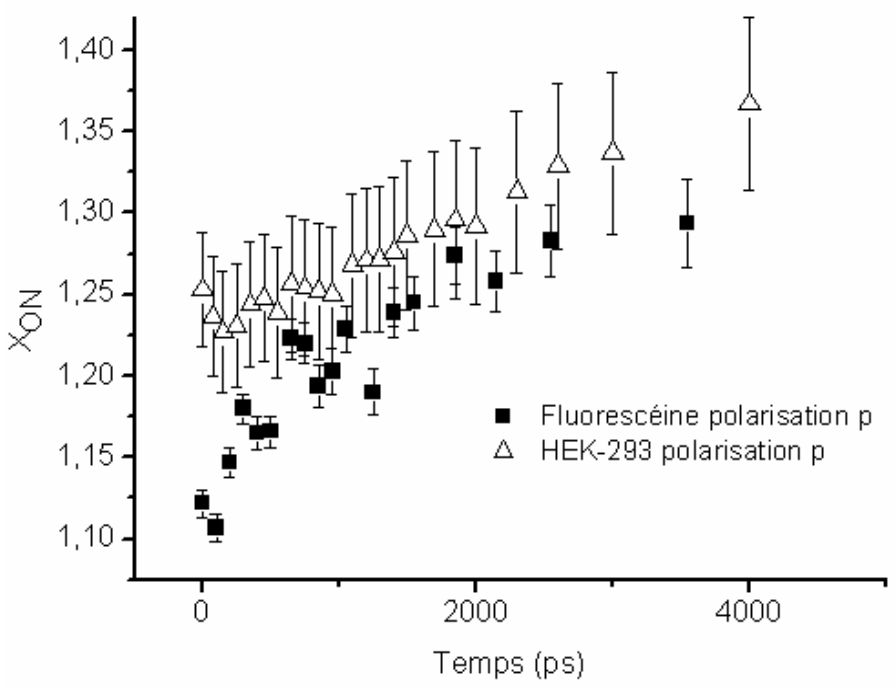


Fig.4.14 : Variations de x_{ON} au cours du temps en prenant en compte la dépolarisation de l'objectif 60x pour une excitation en polarisation p pour une solution de fluorescéine avec 70% de glycérol (■) ou en corrigeant des cellules HEK-293 exprimant l'eGFP cytosolique (Δ).

2.3.2 Déclins d'anisotropie obtenus

L'eGFP est une molécule de taille importante dont le temps de corrélation rotationnelle est très long (compris entre 10 ns et 23 ns, [158], [159]) comparé à sa durée de vie (2,3-2,4 ns, [27], [61]). La diminution de l'anisotropie de fluorescence de eGFP pourra ainsi être liée soit à sa rotation soit à un transfert d'énergie par homoFRET. La figure 4.15.A montre les déclins d'anisotropie de fluorescence moyennés sur 19 cellules exprimant l'eGFP cytosolique (Fig.4.15.B, en haut) et sur 21 cellules exprimant le tandem-eGFP (Fig.4.15.B, en bas).

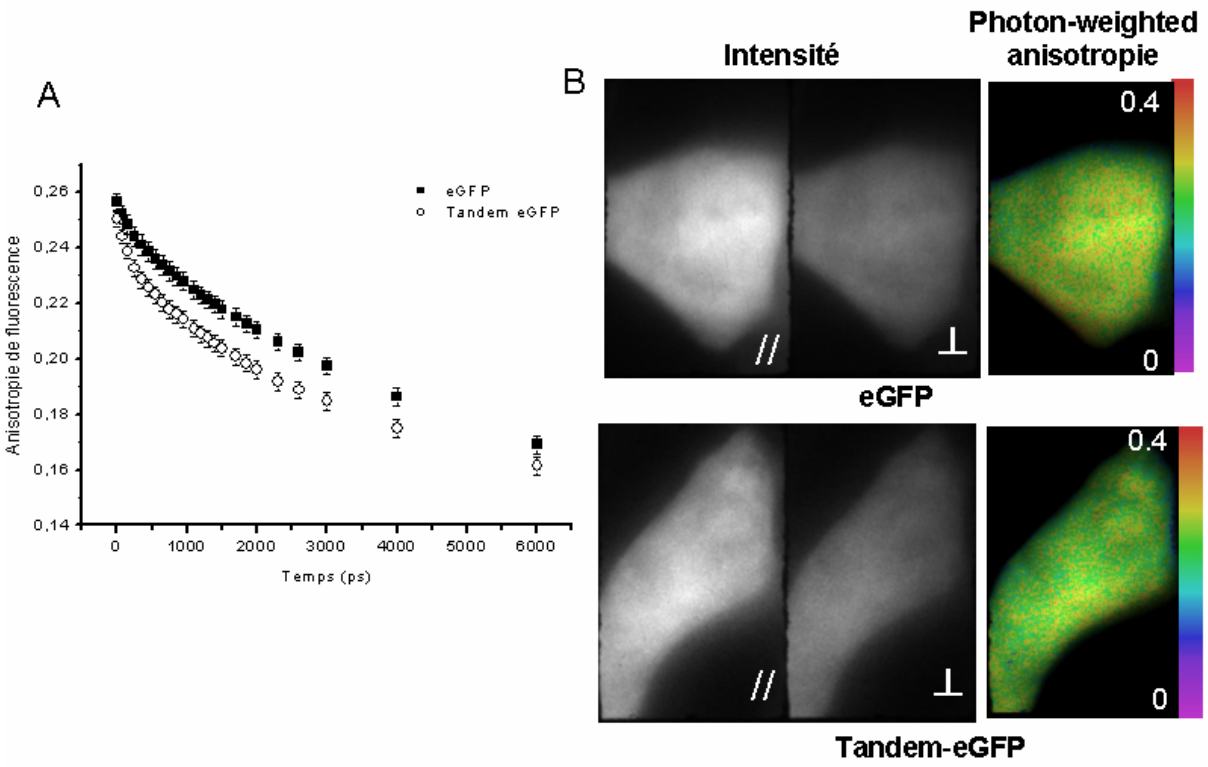


Fig.4.15: (A) Variations au cours du temps de l'anisotropie de fluorescence moyenne de l'eGFP cytosolique (■, 19 cellules) et du tandem-eGFP (○, 21 cellules) exprimées dans des cellules HEK-293 mesurées à l'aide de l'objectif 60x. (B) Exemples représentatifs d'intensité de fluorescence moyenne pour la polarisation parallèle (à gauche) ou perpendiculaire (au centre) par rapport à la polarisation de l'excitation et carte de l'anisotropie de fluorescence moyenne « photon-weighted » (à droite) pour l'eGFP (en haut) et pour le tandem-eGFP (en bas).

Nous constatons sur la figure 4.15.A que les valeurs d'anisotropie initiale sont très proches pour les deux conditions de transfection mais que la décroissance de l'anisotropie de fluorescence est plus rapide dans le cas du tandem-eGFP. Etant donné que l'anisotropie de l'eGFP cytosolique diminue au cours de notre mesure en suivant un modèle biexponentiel, cela signifie qu'elle dimérise et par conséquent que de l'homoFRET a lieu. Nous en déduisons que l'eGFP n'est pas présente uniquement sous forme monomérique dans le cytosol des cellules mais que des formes dimériques ou des oligomères d'ordre plus élevé sont également présents.

Pour quantifier de manière plus précise le transfert d'énergie, nous avons utilisé un ajustement biexponentiel (cf. équation (4.20)) pour chacune des courbes d'anisotropie de fluorescence obtenues pour chaque condition de transfection. Pour les cellules exprimant l'eGFP, nous avons obtenu un temps moyen de dépolarisation ϕ_1 égal à 631 ± 113 ps (n = 19). Nous avons utilisé cette valeur pour ajuster chaque déclin d'anisotropie de fluorescence obtenu sur les cellules exprimant le tandem-eGFP, en utilisant l'équation (4.20). Nous avons ainsi obtenu une valeur moyenne pour la proportion de molécules en interaction *b* égale à (6,6 ± 0,8 %, n = 19) pour eGFP et (13,0 ± 0,3 %, n = 21) pour le tandem-eGFP. Ces pourcentages de molécules en interaction étaient statistiquement différents (*p*-value < 0,0001 avec un t-test non apparié avec correction de Welch, car les variances étaient différentes). Cela indique qu'il y a une plus grande proportion de molécules engagées dans un transfert d'énergie par homoFRET dans le cas du tandem-eGFP par rapport à l'eGFP. Les valeurs moyennes obtenues pour ϕ_2 de (19 ± 1 ns) pour eGFP et de (20,6 ± 0,5 ns) pour le tandem-eGFP sont comparables (t-test non apparié avec correction de Welch, *p*-value = 0,1699). Ces valeurs sont en accord avec les temps de corrélation rotationnelle de l'eGFP [158], [159].

2.4 Anisotropie sous onde évanescente

2.4.1 Condition sur la polarisation de l'excitation

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, pour faire des mesures d'anisotropie de fluorescence, une des conditions est de bien photosélectionner les molécules à l'excitation. En excitation en épifluorescence, on peut être polarisé soit suivant *p* soit suivant *s*. Cela n'aura pas d'incidence en théorie, si ce n'est que la transmission des optiques peut être meilleure pour une des deux polarisations. En revanche, lorsque l'on excite avec une onde évanescente, sa polarisation va dépendre de celle de l'onde incidente (cf. chapitre II) [172]. Ainsi pour une polarisation *s*, le champ évanescent généré sera polarisé selon la normale au plan d'incidence (suivant *y*). Dans le cas d'une polarisation *p*, le champ évanescent sera contenu dans le plan d'incidence (*z*, *x*) mais il se propagera le long de l'interface avec une composante longitudinale non nulle (Fig.4.16). Le champ évanescent *p* est donc polarisé elliptiquement dans le plan (*z*, *x*).

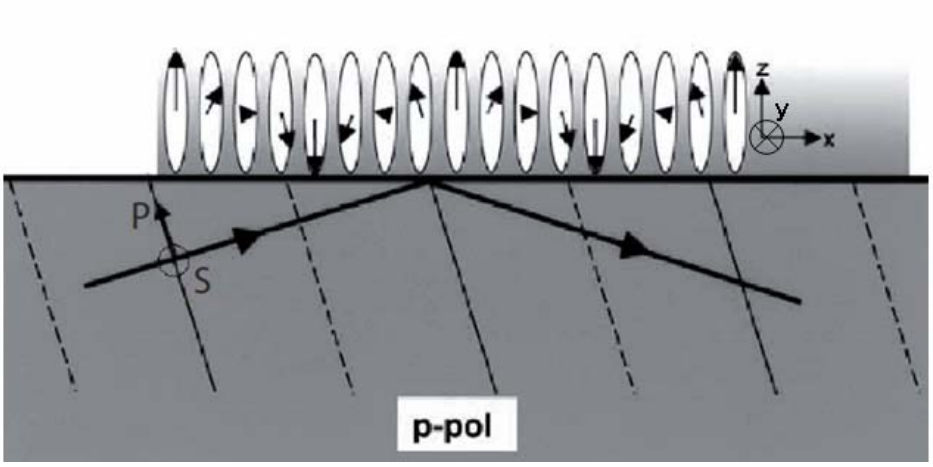


Fig.4.16: Schéma de la photosélection de dipôles excités par une onde évanescente polarisée selon p
D'après [23].

Pour pouvoir faire de l'imagerie en anisotropie de fluorescence avec une excitation sous onde évanescente, la photosélection initiale des fluorophores est nécessaire. Il faut donc que la lumière excitatrice soit polarisée selon *s*, de façon à ne pas exciter à la fois les dipôles parallèles et perpendiculaires à la direction de la polarisation de l'excitation et avoir la condition de photosélection.

2.4.2 Détermination des facteurs correctifs sous excitation TIRF

Dans un premier temps, il nous a fallu déterminer les facteurs correctifs instrumentaux induisant des dépolarisations de la fluorescence, dans le cas d'une excitation en TIRF. Nous avons ainsi cherché à évaluer le facteur *G* ainsi que le facteur x_{ON}.

2.4.2.1 Facteur *G*

De même que pour les mesures d'anisotropie en épifluorescence, nous avons déterminé le facteur *G* en calculant le rapport de $I_{//}(t)/I_{\perp}(t)$ pour une solution de fluorescéine non visqueuse. Etant donné que la polarisation à l'excitation avait été modifiée (passage d'une polarisation *p* à une polarisation *s*), nous avons effectué de nouveau les mesures en épifluorescence, pour une polarisation *s* cette fois-ci.

Nous avons obtenu $G^{obj60}_{epi}(t) = 0{,}967 \pm 0{,}003$ (valeur moyennée sur 16 portes temporelles, en commençant 400 ps après l'impulsion et en s'arrêtant à 6 ns, avant d'être dans le bruit de fond).

Comme dans le cas d'une polarisation selon *p*, nous avons constaté que, pour une polarisation *s*, $G^{obj60}{}_{epi}$ ne varie quasiment pas au cours du temps et nous pouvons considérer qu'il est fixe lorsque nous travaillons avec les valeurs moyennes des anisotropies de fluorescence pour chaque porte temporelle.

Nous avons fait les mêmes mesures dans le cas d'une excitation en TIRF et nous avons obtenu, $G^{obj60}{}_{TIRF}(t) = 0{,}965 \pm 0{,}002$. Les facteurs *G* obtenus en polarisation *s* en excitation en épifluorescence et en TIRF sont comparables (t-test non apparié et sans *a priori*, *p*-value = 0,053, ns).

2.4.2.2 Facteur x_{ON}

La précédente méthode utilisée pour déterminer le facteur de dépolarisation lié à la grande ouverture numérique de l'objectif, x_{ON} ne peut pas être appliquée dans le cas d'une excitation en TIRF. En effet, étant donné que cette méthode repose sur la correction des déclins d'anisotropie de fluorescence obtenus avec l'objectif 60x par rapport à ceux obtenus avec l'objectif 10x, elle n'est pas valable sous excitation TIRF (qui ne peut pas être réalisée avec des objectifs de faible ouverture numérique). Nous n'avons donc pas pu déterminer le facteur de correction directement sous excitation TIRF. Par conséquent, nous l'avons évalué en excitation en polarisation *s*, en corrigeant les déclins d'anisotropie de fluorescence obtenus sur une solution de fluorescéine de forte viscosité (71% de glycérol), en moyennant pour chaque porte temporelle sur 10 acquisitions. Les variations moyennes du facteur de correction x_{ON} pour une excitation polarisée *p* ou *s* sont regroupées sur la figure 4.17. En moyennant les valeurs de x_{ON} obtenues au long du déclin, nous obtenons $x_{ON}{}^{pola\ s}(t) = 1{,}20 \pm 0{,}02$. Nous constatons donc que pour l'objectif 60x, les valeurs de x_{ON} dans le cas d'une excitation polarisée *p* ou polarisée *s* sont similaires. Nous avons par conséquent conservé la valeur de 1,2 pour corriger les déclins d'anisotropie de fluorescence dans le cas d'une excitation en TIRF.

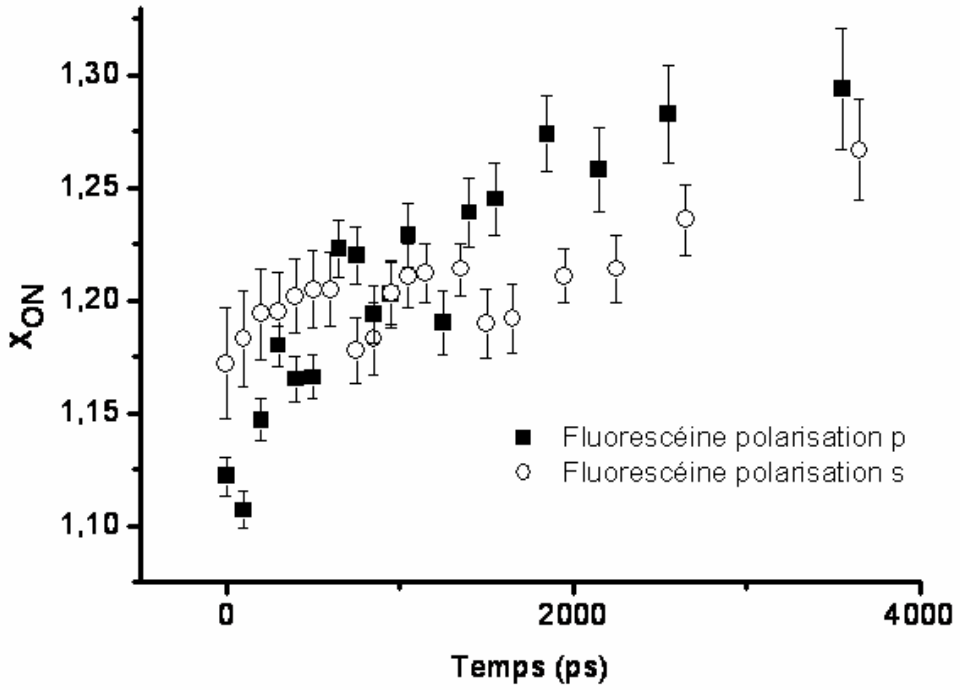


Fig.4.17 : Variations de x_{ON} au cours du temps en prenant en compte la dépolarisation de l'objectif 60x pour une solution de fluorescéine avec 70% de glycérol en excitation en polarisation p (■), une solution de fluorescéine avec 71% de glycérol en excitation en polarisation s (○).

3 Application biologique : dimérisation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

Nous nous sommes intéressés à l'homodimérisation de l'APP, protéine membranaire impliquée dans la maladie d'Alzheimer, dont le rôle a été détaillé dans le chapitre III. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les rôles physiologiques de l'APP dans la maladie d'Alzheimer sont encore mal connus. Comme la plupart des protéines transmembranaires de type I (terminaison N-ter orientée vers le milieu extracellulaire), l'APP a la capacité de dimériser [149]. Cependant, le rôle de cette dimérisation dans les différentes voies de clivage d'APP et par conséquent dans la production du peptide Aβ reste controversé. Les avis sont très partagés par rapport à cette problématique. En effet, des études ont montré que la dimérisation d'APP augmentait la production du peptide Aβ [150], [151], [153]. Ainsi la formation d'un dimère APP favoriserait l'action de ses enzymes de clivage (β- et γ-secrétases). Cependant, il a également été démontré que la dimérisation de l'APP pouvait diminuer la production du peptide Aβ [152]. Afin de développer des outils thérapeutiques adéquats, il est donc crucial de comprendre la nature du rôle de la dimérisation de l'APP dans le processus de production du peptide amyloïde.

Dans ce contexte, nous avons utilisé deux formes de l'APP : une forme sauvage de l'APP (wtAPP-eGFP) et une forme mutée mAPP-eGFP (mutation L17C, [151]). La mutation de la leucine 17 en cystéine va permettre la formation d'un pont disulfure entre deux APP mutés et donc la formation de dimères constitutifs, comme le confirme le résultat obtenu par *western blot* (technique de biologie moléculaire qui consite à séparer les protéines par électrophorèse, uniquement en fonction de leur taille, puis à les transférer sur membrane pour les rendre accessibles à différents marquages immunologiques, etc…) de la figure 4.18, réalisé par Jack-Christophe Cossec, dans l'équipe de Marie-Claude Potier et Charles Duyckaerts, à l'ICM.

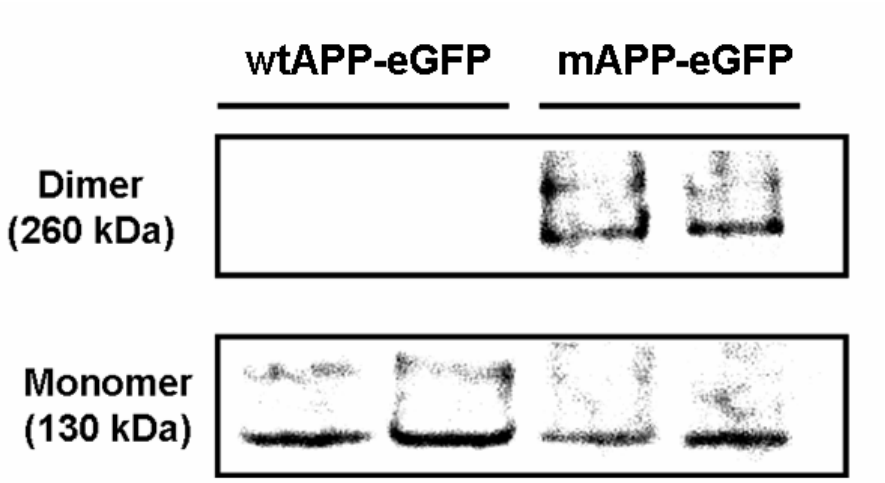


Fig.4.18: Effet de la mutation L17C sur la dimérisation de l'APP. Les cellules HEK-293 exprimant wtAPP-eGFP (à gauche) ou la forme mutée mAPP-eGFP (à droite) ont été analysées par une électrophorèse sur gel suivie d' un western blot avec un anticorps anti-GFP. Dans ces conditions, seuls les monomères (130 kDa) et les dimères (260 kDa) seront détectés.

3.1 Mesures sous excitation en épifluorescence

Nous avons effectué des mesures d'anisotropie de fluorescence résolue en temps sur des cellules HEK-293 exprimant soit la forme sauvage de l'APP soit la forme mutée en excitation en épifluorescence. La figure 4.19 regroupe les déclins moyens obtenus pour wtAPP-eGFP (16 cellules) et pour la forme mutée (27 cellules). La figure 4.19.B montre des exemples de carte d'intensité moyenne pour chacune des deux polarisations et d'anisotropie moyenne combinée à l'image

d'intensité moyenne (*photon-weighted images*) dans le cas de l'expression de wtAPP-eGFP (en haut) et de mAPP-eGFP (en bas).

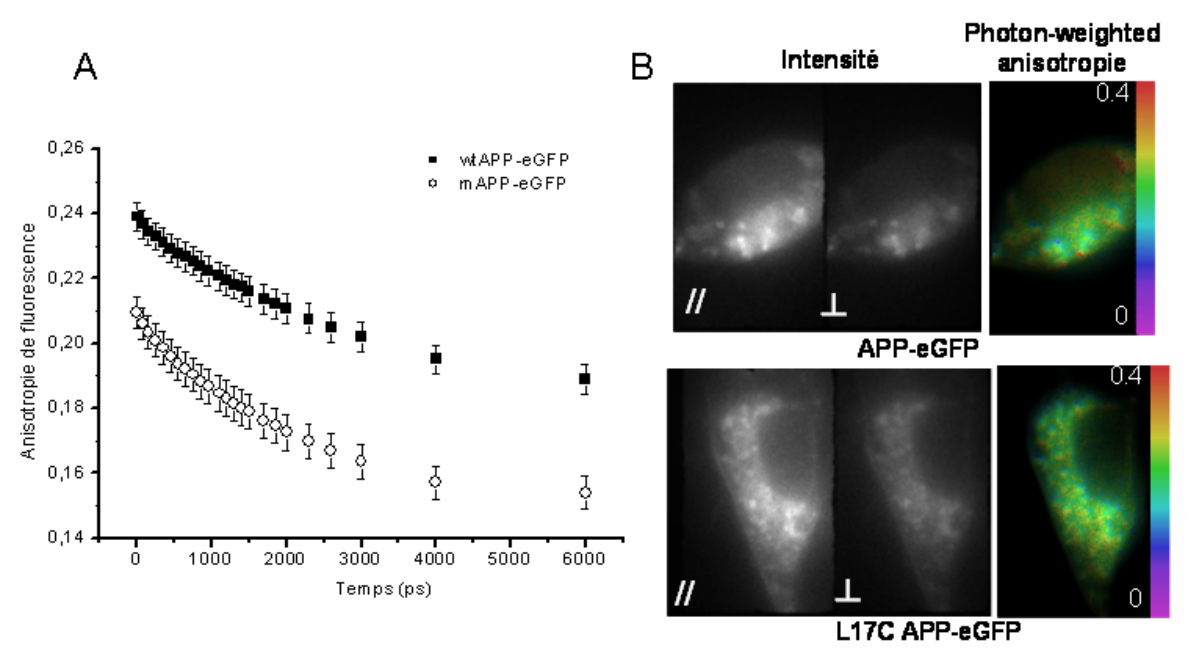


Fig.4.19: (A) Variations au cours du temps de l'anisotropie de fluorescence moyenne de wtAPP-eGFP (■ , 16 cellules) et de mAPP-eGFP (○, 27 cellules) exprimées dans des cellules HEK-293 mesurées à l'aide de l'objectif 60x en excitation en épifluorescence. (B) Exemples représentatifs d'intensité de fluorescence moyenne pour une polarisation parallèle (à gauche) ou perpendiculaire (au centre) par rapport à la polarisation de l'excitation et carte de l'anisotropie de fluorescence moyenne « photon-weighted » (à droite) pour wtAPP-eGFP (en haut) et pour mAPP-eGFP (en bas).

L'anisotropie de fluorescence mesurée à la première porte temporelle est plus faible dans le cas de la forme mutée de l'APP que dans le cas de la forme sauvage (Fig.4.19.A). Cela peut s'expliquer par un transfert d'énergie très rapide ayant lieu avant la première acquisition. Nous avons tout d'abord utilisé un modèle biexponentiel pour ajuster les déclins d'anisotropie obtenus pour chaque cellule (équation (4.20)). Nous avons obtenu des temps courts de dépolarisation pour ϕ_1, qui rendent compte du transfert d'énergie par homoFRET. Nous avons par ailleurs extrait des temps de corrélation très longs pour ϕ_2 (>80 ns). Ces temps très longs peuvent être dus à une rotation contrainte de l'eGFP fusionnée à l'APP transmembranaire et/ou à une orientation privilégiée des dipôles quand un transfert par homoFRET a lieu. Nous avons choisi de regrouper ces paramètres sous un terme d'anisotropie résiduelle *C* et avons ajusté chacun des déclins d'anisotropie de fluorescence obtenus en utilisant le modèle suivant :

$$r(t) = (r_0 - C)\exp\left(-\frac{t}{\phi_1}\right) + C \qquad (4.27)$$

Pour les cellules exprimant wtAPP-eGFP ou mAPP-eGFP, nous avons obtenu une valeur moyenne pour ϕ_1 égale à (3,6 ± 0,4 ns, n = 16) et à (2,4 ± 0,1 ns, n = 27) respectivement. Ces temps de dépolarisation très rapides associés à un transfert d'énergie par homoFRET étaient statistiquement différents (*p*-value = 0,0028 avec un t-test non apparié avec correction de Welch). Le temps de transfert d'énergie plus court dans le cas de la forme mutée de l'APP rend compte d'une vitesse de transfert d'énergie plus rapide dans ce cas. Cela est directement lié à la modification de la structure du mutant, construit pour former un dimère constitutif. Nous pouvons donc quantitativement et statistiquement différencier les vitesses de transfert d'énergie associées à la dimérisation de la forme sauvage ou de la forme mutée d'APP en excitation en épifluorescence.

3.2 Mesures sous excitation TIRF

Ces mêmes mesures ont également été effectuées sur des cellules HEK-293 sous excitation TIRF, afin de déterminer s'il était possible de discerner des différences de dimérisation des deux formes de la protéine, à la membrane plasmique des cellules. Les déclins d'anisotropie moyenne obtenus pour l'APP sauvage et muté sont présentés sur la figure 4.20.A. Comme pour une excitation en épifluorescence, l'anisotropie de fluorescence obtenue à la première acquisition est plus faible dans le cas de mAPP-eGFP, ce qui peut s'expliquer par un transfert d'énergie très rapide et se produisant avant la première porte temporelle.

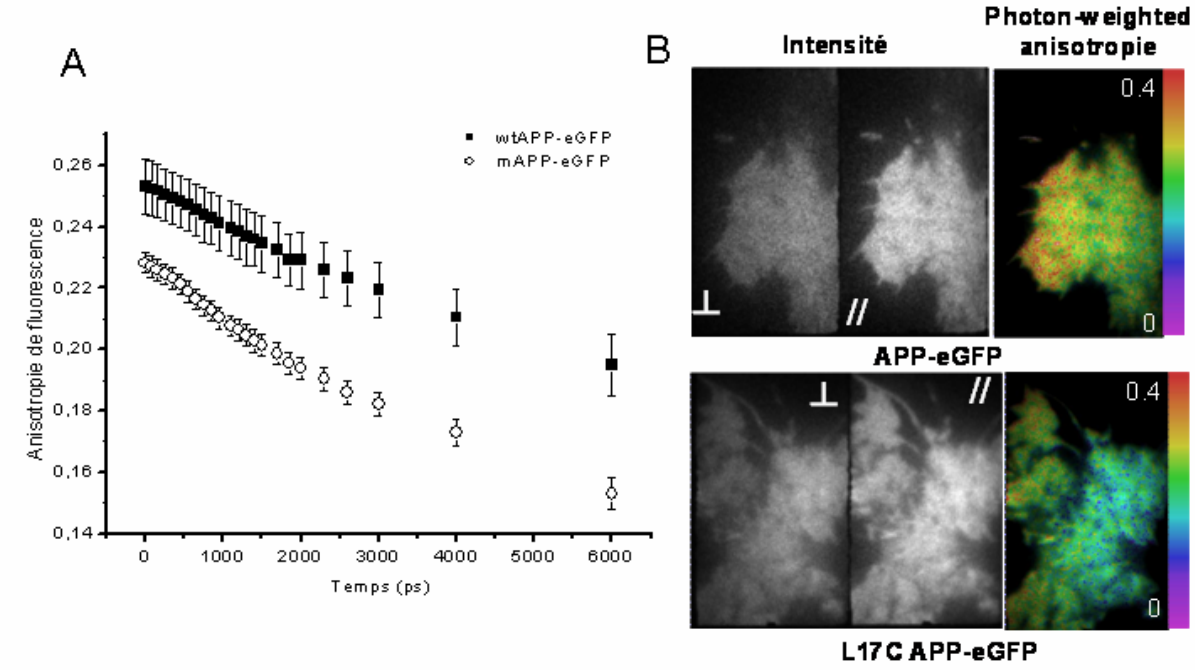


Fig.4.20: (A) Variations au cours du temps de l'anisotropie de fluorescence moyenne de wtAPP-eGFP (■, 8 cellules) et de mAPP-eGFP (○, 9 cellules) exprimées en cellules HEK-293 mesurées à l'aide de l'objectif 60x en excitation en TIRF. (B) Exemples représentatifs d'intensité de fluorescence moyenne pour une polarisation parallèle (à gauche) ou perpendiculaire (au centre) par rapport à la polarisation de l'excitation et carte moyenne de l'anisotropie de fluorescence moyenne « photon-weighted » (à droite) pour wtAPP-eGFP (en haut) et pour mAPP-eGFP (en bas).

Sous excitation TIRF, pour les cellules exprimant wtAPP-eGFP ou mAPP-eGFP, nous avons obtenu une valeur moyenne pour ϕ_1 égale à (7,4 ± 0,5 ns, n = 8) et à (5,4 ± 0,3 ns, n = 9) respectivement. Ces temps de dépolarisation très rapides associés à un transfert d'énergie par homoFRET étaient significativement plus courts dans le cas de la forme mutée de la protéine APP par rapport à la forme sauvage (*p*-value = 0,0025 avec un t-test non apparié). Ces résultats montrent que nous pouvons aussi quantitativement et statistiquement différencier les vitesses de transfert d'énergie associées à la dimérisation de la forme sauvage ou de la forme mutée de la protéine APP, sous excitation TIRF.

3.3 Discussion et conclusions

Grâce au dispositif d'imagerie d'anisotropie de fluorescence résolue en temps, implémenté sur notre microscope TIRFLIM, nous pouvons mesurer le temps de corrélation rotationnelle de fluorophores, ce qui est un moyen efficace de sonder la viscosité de leur environnement. Ces mesures peuvent être effectuées à l'aide d'objectif à faible ou à grande ouverture numérique, grâce à la détermination du facteur de correction prenant en compte la dépolarisation des objectifs à grande ouverture numérique en épifluorescence. Ce facteur de dépolarisation n'a pas pu être évalué en TIRF,

étant donné qu'il nécessite de faire des mesures avec un objectif de faible ouverture numérique, n'induisant pas de dépolarisation. Il subsiste donc une imprécision sur le facteur correctif prenant en compte la dépolarisation de l'objectif à forte ouverture numérique en TIRF. Une alternative pour évaluer les facteurs de dépolarisation serait de faire l'imagerie du plan focal arrière de l'objectif. Ces mesures permettraient d'avoir directement des informations sur les composantes de polarisation en fonction de l'ouverture numérique.

L'homoFRET mis en évidence par la mesure de l'anisotropie de fluorescence est une très bonne méthode pour suivre la dimérisation de protéines. Cette technique ne nécessite l'expression que d'un seul marqueur fluorescent, ce qui permet de s'affranchir des problèmes liés aux différences de niveaux d'expression dans le cas d'un double marquage. De plus, la transfection de deux plasmides est extrêmement difficile pour certains types cellulaires notamment pour les cultures primaires.

Notre dispositif tr-FAIM permet de détecter de l'homoFRET et donc de sonder l'homodimérisation de protéines. Pour le vérifier des mesures ont été réalisées sur des cellules HEK-293 exprimant l'eGFP cytosolique ou un dimère de l'eGFP. Les analyses statistiques effectuées ont montré que la proportion de molécules en interaction était plus importante dans le cas du tandem-eGFP.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle potentiel de la dimérisation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) dans le processus de production du peptide amyloïde. De premières mesures ont été réalisées sur des cellules HEK-293 exprimant soit la forme sauvage (wtAPP-eGFP) soit une forme mutée (mAPP-eGFP) formant des dimères covalents de l'APP. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des transferts d'énergie par homoFRET pour la forme sauvage ainsi que pour la forme mutée de la protéine APP, pour les deux conditions d'excitation en épifluorescence et en TIRF. Pour les deux conditions d'excitation, les temps associés aux transferts d'énergie par homoFRET peuvent être différenciés avec un transfert plus rapide dans le cas de la forme mutée de la protéine APP que dans le cas de la forme sauvage. De plus, comme un transfert d'énergie plus rapide que notre résolution temporelle semble se produire pour la forme mutée d'APP, il est probable que la différence entre les temps de dépolarisation liés au transfert d'énergie par homoFRET, pour la forme sauvage et pour la forme mutée, soit en réalité plus importante. Cela montre néanmoins que nous pouvons distinguer des vitesses de transfert d'énergie par homoFRET différentes à la membrane plasmique et dans le cytoplasme des cellules. Nous pouvons donc mettre en évidence avec notre dispositif tr-FAIM des profils de dimérisation propres à chacune des différentes structures moléculaires des dimères.

Les expériences concernant la dimérisation de l'APP vont être poursuivies dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'augmentation du cholestérol membranaire va induire une augmentation de la production du peptide amyloïde. Cette augmentation passe par une relocalisation de l'APP dans les radeaux lipidiques. L'hypothèse que nous avons faite est la suivante : l'augmentation du cholestérol au niveau de la membrane plasmique concentre l'APP dans les rafts, favorisant sa dimérisation. Le dimère d'APP serait alors un meilleur substrat pour les enzymes, augmentant ainsi la production du peptide amyloïde. Pour répondre à cette problématique, des cinétiques pour suivre la variation de l'anisotropie de fluorescence vont être effectuées en modifiant à la hausse le cholestérol membranaire. Cela va permettre d'explorer l'effet de l'augmentation du cholestérol membranaire sur la dimérisation d'APP.

Ce dispositif d'anisotropie de fluorescence couplé à un microscope TIRF nous permet donc d'étudier l'homodimérisation de protéines d'intérêt de la membrane plasmique à l'intérieur des cellules. Cela ouvre la voie à de nombreuses applications biologiques comme par exemple, l'étude de l'effet de ligands différents ou de composés à visée thérapeutique sur l'homodimérisation de protéines membranaires ou de récepteurs impliqués dans des pathologies [160], etc…

De plus, une des applications de notre dispositif est d'évaluer la viscosité intracellulaire. Des premières expériences ont ainsi été menées, en collaboration avec l'équipe de Klaus Suhling du King's College à Londres, pour mesurer l'anisotropie au niveau des mitochondries et extraire les temps de

corrélation rotationnelle pour les relier à la viscosité sous-jacente. En effet, la viscosité est un des paramètres qui affecte la diffusion des molécules et des protéines et des changements de viscosité peuvent être reliés à des dysfonctionnements au niveau cellulaire. Obtenir une image des temps de corrélation rotationnelle, qui permettrait de connaître les viscosités localement dans la cellule, serait une autre approche pour sonder l'environnement cellulaire. De nouvelles expériences devraient être prochainement effectuées pour étudier les microviscosités dans les mitochondries en utilisant la rhodamine 123.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

L'objectif de mon travail était d'allier les développements technologiques en imagerie de fluorescence résolue en temps à la réponse à des problématiques biologiques concrètes. Ainsi, afin de suivre des interactions entre protéines en neurobiologie, nous avons développé un microscope en réflexion totale interne résolue en temps (TIRFLIM) et en polarisation (tr-FAIM).

L'imagerie de FRET est un outil efficace pour sonder la proximité entre protéines. Pour mettre en évidence des interactions protéiques, nous avons choisi d'utiliser la mesure de durée de vie de fluorescence (FLIM) car celle-ci est indépendante de la concentration des fluorophores et souffre moins du photoblanchiment. Afin d'obtenir une résolution suffisante pour nos problématiques neurobiologiques, cette technique FLIM a été associée à la microscopie TIRF. Celle-ci permet d'observer les évènements ayant lieu au niveau de la membrane plasmique des cellules en plein champ avec une résolution axiale sub-longueur d'onde. Pour avoir accès à nos échantillons, une configuration à travers l'objectif a été choisie pour réaliser notre dispositif d'imagerie en réflexion totale interne (TIRF). Nous avons utilisé un intensificateur à déclenchement périodique pour échantillonner le déclin de fluorescence dans le but de préserver le caractère plein champ pour les mesures de durée de vie. Pour l'excitation, afin de ne pas être limité dans le choix des fluorophores, nous avons utilisé un laser picoseconde supercontinuum, pour l'accordabilité de sa longueur d'onde d'excitation et sa compatibilité avec les mesures de durée de vie de fluorescence.

Une première partie de ce travail a consisté en l'optimisation de notre microscope TIRFLIM. Le contrôle de l'angle d'incidence sous excitation TIRF, nous assure ainsi une reproductibilité des conditions d'excitation. Nous pouvons également passer d'une excitation en mode épifluorescence à une excitation en mode TIRF pour suivre l'activité des protéines respectivement dans des cellules ou uniquement à la membrane plasmique.

Par ailleurs, le couplage avec des surfaces plasmoniques a permis d'étudier les effets de l'interface sur la mesure de durée de vie de fluorescence. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente générée pourra être extraite de ces mesures. De plus, ces surfaces plasmoniques sont compatibles avec l'imagerie en cellules vivantes. Les durées de vie de fluorescence mesurées peuvent ainsi être reliées à différentes distances des fluorophores par rapport à l'interface, ce qui peut être intéressant dans le suivi de processus d'internalisation.

La résolution en polarisation a également été implémentée sur notre dispositif pour effectuer des mesures d'anisotropie de fluorescence résolue en temps. Les différentes sources de dépolarisation induites par l'excitation, la détection et l'utilisation nécessaire d'objectifs à grande ouverture numérique pour le mode TIRF, ont été quantifiées. Nous avons également proposé une approche expérimentale pour corriger les mesures d'anisotropie de fluorescence de la dépolarisation induite par l'objectif à grande ouverture numérique lors d'une excitation en épifluorescence. La mesure de l'anisotropie de fluorescence a entre autres permis de mesurer les temps de corrélation rotationnelle de molécules placées dans des solutions de différentes viscosités. Il serait intéressant d'extraire de ces mesures, les images des temps de corrélation rotationnelle, ce qui renseignerait sur la viscosité locale des cellules et rajouterait un outil de contraste supplémentaire en imagerie.

Grâce à ce dispositif tr-TIRFAIM (*time-resolved Total Internal Reflection Fluorescence Anisotropy Imaging Microscope*) doté d'une enceinte thermostatée et régulée en CO_2 pour respecter les conditions physiologiques des cellules, nous avons pu mettre en évidence l'hétérodimérisation de deux protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer (APP et BACE1). Un suivi dynamique de l'effet du cholestérol sur ces protéines a ainsi été réalisé, de la membrane jusqu'à l'intérieur des cellules. Cette étude a permis de décrire la manière dont l'augmentation du cholestérol membranaire induit un rapprochement entre la protéine APP et son enzyme de clivage BACE1 d'abord à la membrane plasmique puis dans les endosomes, ce qui aboutit à une augmentation de la production du peptide amyloïde, qui va ensuite s'accumuler dans les plaques séniles. De plus, la mesure de l'anisotropie de fluorescence a mis en évidence l'homodimérisation d'APP et a permis de distinguer différents motifs d'homodimérisation associés à des variants de l'APP.

Notre dispositif TIRF a été associé à la mesure de durée de vie de fluorescence ainsi qu'à la mesure d'anisotropie de fluorescence, dans le but principal de suivre des interactions protéiques. Une autre approche pourrait être de combiner notre microscope TIRF à une technique permettant de faire de la superlocalisation (PALM/STORM). Cette combinaison serait un moyen efficace pour améliorer la résolution spatiale du dispositif. Des mesures de colocalisation pourraient également être faites en utilisant du PALM à deux couleurs par exemple, ce qui serait une approche complémentaire à l'imagerie de FRET pour suivre des interactions entre protéines.

Les interactions moléculaires et les facteurs susceptibles de jouer sur ces interactions, ayant lieu au niveau membranaire ou intracellulaire, peuvent ainsi être suivis grâce à notre microscope. Ce microscope constitue donc une « microsonde » de l'environnement local des fluorophores et peut renseigner sur la viscosité, la température, les interactions moléculaires, la nanotopologie… Ces fonctions multiples et complémentaires en font un outil original pour l'étude et la compréhension de mécanismes biologiques complexes.

ANNEXES

ANNEXE II.1 : Caractérisation du microscope TIRFLIM

Caractéristiques de la source Supercontinuum SC400-2 (*Fianium*)

A

	Blue-enhanced Fixed Repetition Rate Supercontinuum Systems		
Model	**SC400-6**	**SC400-4**	**SC400-2**
Total Power (full spectrum)	>6W	>4W	>2W
Visible Power (400-750nm)	>900mW	>600mW	>300mW
Average Spectral Power Density	>3mW/nm	>2mW/nm	>1mW/nm
Spectral Flatness	<6dB		
Power Stability	<±1%		
Repetition rate[1]	Fixed 60MHz (optional: 80MHz)	Fixed 40MHz	Fixed 20MHz
Minimum Wavelength	<420nm		
Maximum Wavelength	>2200nm		
Fundamental Pulsewidth	≈6ps		
Output Optic	Free space, Collimated		
Beam Diameter	≈2mm @ 633nm		
Armoured Fibre length	1.5m		
State of polarisation	Unpolarized		

B

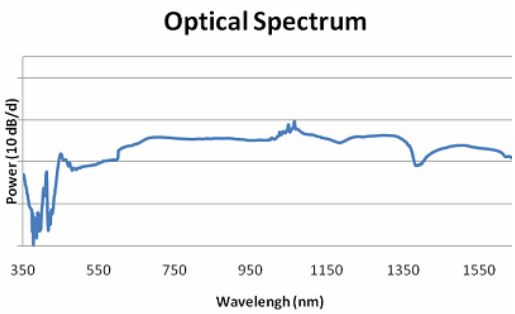


Fig.2.1.1 : (A) Tableau indiquant les spécifications de la source Fianium SC400-2, fournie par le constructeur. (B) Variations de la puissance délivrée par la source SC400-2 en fonction de la longueur d'onde (Fianium).

Caractéristiques de la mire USAF

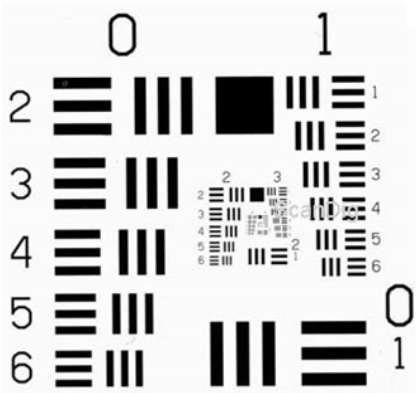


Fig. 2.1.2: Mire USAF 1951.
Elle est composée de sept groupes constitués chacun de six éléments. Un élément est défini comme trois traits noirs intercalés avec deux traits blancs.

Spécifications de la mire USAF

RES-1	Traits sur fond opaque chromé (DO 2) sur substrat de verre optique (DO 2) 50 x 50 x 1.5 mm
RES-2	Lignes noires sur fond blanc en papier cartonné 50 x 50 mm

Paires de lignes par millimètre								
Numéro d'élément	**Numéro de groupe**							
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1	1,00	2,00	4,00	8,00	16,00	32,00	64,00	128,00
2	1,12	2,24	4,49	8,98	17,96	35,92	71,84	143,70
3	1,26	2,52	5,04	10,08	20,16	40,32	80,63	161,30
4	1,41	2,83	5,66	11,31	22,63	45,25	90,51	181,00
5	1,59	3,17	6,35	12,70	25,40	50,80	101,60	203,20
6	1,78	3,56	7,13	14,25	28,51	57,02	114,00	228,10
Paire de traits/mm = LP				Largeur trait (mm) = 1/(2LP)				
Espacement (mm) - 1/(2LP)				Longueur trait = 5(largeur trait)				

Tab. 2.1.1: Tableau récapitulatif des spécifications de la mire USAF.

Mesure du grossissement de la voie de détection résolue en temps

Mode	**G&E&**	**Grossissement**
User2	G5E1	12,5
		12,7
	G5E2	12,6
		12,9
Comb 800ps	G5E1	12,7
		12,7
	G2E3	12,6
		12,6
User2	G2E3	12,6
		12,6
	Moyenne	**12,6**
	Ecart-type	**0,1**

Tab.2.1.2: Mesure du grossissement de la chaîne de détection résolue en temps en imageant une mire USAF et en utilisant un objectif 5×.

Calibration de la voie de détection résolue en temps

Mode	**Largeur de la porte temporelle (ps)**	**Echantillon**	F_{cobjet} **(mm^{-1})**	F_{cimage} **(mm^{-1})**
Comb Low	1000	G7E6	228,1	18,1
	900	G7E6	228,1	18,1
	800	G7E5	203,2	16,1
	700	G7E5	203,2	16,1
	600	G7E4	181	14,4
	500	G7E5	203,2	16,1
	400	G7E3	161,3	12,8
	300	G7E1	128	10,2
	200	G7E1	128	10,2
DC		G7E6	228,1	18,1
User2		Toutes les fréquences de la mire sont résolues		

Tab.2.1.3 : Caractérisation de la fréquence de coupure de l'intensificateur en fonction des différents modes. Le mode DC est assimilable à un mode continu. Il va permettre d'ouvrir des portes tant qu'un bouton sera enclenché. $F_{c\,objet}$ désigne la fréquence de coupure mesurée dans le plan de la mire et $F_{c\,image}$ celle ramenée dans le plan de l'intensificateur via $F_{cimage} = \dfrac{F_{cobjet}}{G_{FLIM}}$.

ANNEXE II.2 : Condition d'existence et de couplage des ondes de surface

Considérons une onde scalaire à deux dimensions et monochromatique de pulsation ω :

$$E(x,z,t) = \mathrm{Re}\left[E(x,z)e^{-i\omega t}\right] \tag{2.2.1}$$

On suppose que le champ $E(x, z=0)$ est connu et qu'il se propage vers les z positifs. D'après l'équation d'Helmholtz et la transformée de Fourier du champ, on peut écrire le champ dans chacun des deux milieux de la forme ci-dessous :

$$\vec{E}_1 e^{ikx-i\gamma_1 z}e^{-i\omega t} \text{ dans le milieu 1 avec } \gamma_1^2 = \varepsilon_1 \frac{\omega^2}{c^2} - k^2 \text{ et } \mathrm{Im}(\gamma_1) > 0$$

$$\vec{E}_2 e^{ikx+i\gamma_2 z}e^{-i\omega t} \text{ dans le milieu 2 avec } \gamma_2^2 = \varepsilon_2 \frac{\omega^2}{c^2} - k^2 \text{ et } \mathrm{Im}(\gamma_2) > 0$$

où k correspond à la composante du vecteur d'onde de propagation le long de l'interface et γ_i à sa projection suivant z pour chacun des deux milieux. c représente la célérité de la lumière (cf. chapitre II, Fig.2.22.b).

- Considérons d'abord une polarisation transverse électrique (TE).

Les champs s'écrivent sous la forme :

$$\vec{E}_1 = E_{1y}\vec{e}_y \tag{2.2.2}$$

$$\vec{E}_2 = E_{2y}\vec{e}_y \tag{2.2.3}$$

Or les relations de continuité du champ E_y et de $\frac{\partial E_y}{\partial z}$ en $z = 0$ imposent que :

$$\gamma_1 + \gamma_2 = 0 \tag{2.2.4}$$

La relation (2.2.4) est incompatible avec les conditions initiales $\mathrm{Im}(\gamma_i) > 0$ avec ($i = 1, 2$). On en déduit donc que l'on ne peut pas générer d'onde évanescente en polarisation TE (c'est-à-dire en polarisation s).

- Considérons une polarisation transverse magnétique (TM).

Dans cette configuration, on a :

$$\vec{E}_1 = E_{1x}\vec{e}_x + E_{1z}\vec{e}_z \tag{2.2.5}$$

$$\vec{E}_2 = E_{2x}\vec{e}_x + E_{2z}\vec{e}_z \tag{2.2.6}$$

La condition de continuité de $E_{tangentiel}$ impose : $E_{1x} = E_{2x} = E_x$.

D'après les équations de Maxwell, chaque milieu étant homogène et non chargé, on a : $div\vec{E}_i = 0$ et $div\vec{D}_i = 0$ avec $\vec{D}_i = \varepsilon_0\varepsilon_i\vec{E}_i$ (ε_0 permittivité électrique du vide et ε_i la permittivité relative électrique du milieu i ($i = 1, 2$).

On en déduit donc :

$$E_{1z} = \frac{k}{\gamma_1}E_x \tag{2.2.7}$$

$$E_{2z} = -\frac{k}{\gamma_2}E_x \tag{2.2.8}$$

La continuité de $\vec{D}$ impose par ailleurs la relation :

$$\varepsilon_1 E_{1z} = \varepsilon_2 E_{2z} \tag{2.2.9}$$

A l'aide des trois dernières relations, on déduit :

$$\varepsilon_2 \gamma_1 + \varepsilon_1 \gamma_2 = 0 \tag{2.2.10}$$

C'est la condition nécessaire (2.2.10) pour avoir une onde de surface en polarisation TM. On constate ainsi que si $\varepsilon_2 > 0$, il faut que $\varepsilon_1(\omega) < 0$.
D'après la relation précédente (2.2.10) et les expressions de γ_i, on en déduit la relation de dispersion ci-dessous:

$$k(\omega) = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_1(\omega)\varepsilon_2}{\varepsilon_1(\omega)+\varepsilon_2}} \tag{2.2.11}$$

En résumé, on peut générer des ondes de surface si $\mathrm{Re}(\varepsilon_1(\omega)) < 0$ et inférieur à $-\varepsilon_2$ (pour que k soit réel) et uniquement pour une polarisation TM du champ.

De plus, d'après le modèle de Drude :

$$\varepsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_P^2}{\omega^2} \tag{2.2.12}$$

où $\omega_P^2 = \dfrac{ne^2}{m\varepsilon_0}$ représente la pulsation du plasma associé, n correspondant au nombre de charge et m à la masse de l'électron. On en déduit donc d'après la condition de dispersion (2.2.11), la relation de dispersion du plasmon de surface avec $\varepsilon_2 = 1$ dans le cas où le milieu 2 est le vide ou l'air:

$$k_{SP}(\omega) = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_1(\omega)}{\varepsilon_1(\omega)+1}} \tag{2.2.13}$$

ANNEXE II.3 : Marquages utilisés en SPETIRF

Marquage avec *CellMask Orange plasma membrane stain* :

- Décongeler le marqueur et le centrifuger.
- Dilution de la solution mère (5 mg/mL) 1000 fois dans du PBS (solution tampon) préalablement chauffé pour obtenir une solution à 5µg /mL.
- Appliquer sur les cellules préalablement mises à adhérer sur la surface métallique placée dans la chambre de culture.
- Laisser incuber pendant 5 min à 37°C.
- Effectuer 3 rinçages au PBS en faisant attention à ne pas décoller les cellules.
- Observer dans le PBS avec un film parafilm pour observation sur cellules vivantes sinon fixer au PFA en suivant le protocole.

Marquage à la toxine cholérique-Alexa 555:

- Préparer la solution mère du marqueur en ajoutant 100 µL de PBS dans 100 µg de poudre.
- Déposer les cellules préalablement décollées et resuspendues dans 2 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sur l'échantillon souhaité 3-4 h avant le marquage pour qu'elles adhèrent et les placer dans l'incubateur.
- Marquage : ajouter 2 µL de marqueur sur les cellules déposées sur l'échantillon et placées dans le DMEM complet.
- Placer l'échantillon 30 min à 37°C.
- Effectuer deux rinçages au PBS en faisant attention de ne pas décoller les cellules.
- Fixer au PFA par la suite si nécessaire.

Fixation au Paraformaldéhyde (PFA) :

- Déposer 1 mL de PFA (4%, pH = 7, température ambiante) sur l'échantillon à fixer de façon à bien recouvrir toute sa surface.
- Laisser reposer pendant 10 min à température ambiante.
- Effectuer 2 à 3 rinçages avec du PBS.
- Observer en recouvrant l'échantillon de PBS.
- Conserver au réfrigérateur dans le PBS.

ANNEXE III.1 : Transfection chimique

Le plasmide BACE1-GFP a été donné par le Dr Bradley Hyman (Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA, Etas-Unis) et le plasmide APP_{751} par le Dr Frédéric Checler (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France).

Les cellules HEK-293 ont été cultivées dans du DMEM complémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal), 1% de pénicilline G (100 U/mL)/streptomycin (100 µg/mL) et 1% de L-glutamine. Ces cellules ont été transfectées avec les plasmides d'intérêt en utilisant le kit DNA/Effectene (*Qiagen*, Hilden, Allemagne). Pour le contrôle BACE1-GFP seul, nous avons transfecté 2 µg/µL du plasmide. Pour l'expérience de FRET, nous avons co-exprimé BACE1-GFP (0,5 µg/µL) et APP-mCherry (2 µg/µL). Les cellules ont été maintenues à 37°C et à 5% de CO_2 dans des labteck® préalablement recouvertes (*coating*) de Poly-Alyl-Amine (PAA) pour éviter que les cellules ne se décollent lors des rinçages notamment. Les détails de la transfection et du *coating* au PAA sont explicités ci-dessous.

Principe d'une transfection

La transfection est un processus de transfert de gènes par lequel de l'ADN exogène est introduit dans des cellules eucaryotes (qui possèdent un noyau). Dans notre cas, il s'agit de transfections transitoires (kit de transfection *Qiagen*) c'est-à-dire que l'ADN ne s'est pas inséré dans le génome cellulaire. Un protocole dépendant du kit de transfection utilisé notamment est à respecter. La méthode utilisée pour réaliser la transfection est d'inclure l'ADN à transfecter dans des micelles (agrégat sphéroïdal de molécules possédant une tête polaire hydrophile dirigée vers le solvant et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur). Ces micelles possèdent des propriétés structurelles analogues à celles des membranes cellulaires, qui leur permettent de fusionner effectivement avec elles, libérant l'ADN dans le cytoplasme de la cellule. Cet ADN utilisera transitoirement la machinerie enzymatique de la cellule pour sa transcription en ARN, sa traduction en protéine qui sera exprimée et adressée. Dans notre cas, on utilise des plasmides (molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de réplication autonome) d'ADN superenroulé qui codent pour la protéine APP couplée au fluorophore souhaité (CFP, YFP, GFP ou mCherry).

Protocole expérimental pour réaliser une transfection transitoire

1. Réalisation du mix de transfection

Le mix est constitué de quatre éléments :
- la solution tampon
- l'ADN à transfecter
- l'enhancer
- l'effectene

Dans un premier temps, mettre 190 µL de tampon dans un petit tube stérile (1 mL). Vortexer le tube contenant l'ADN ainsi que celui contenant l'enhancer. Ajouter la quantité d'ADN souhaitée (entre 0,5 µL et 3 µL pour avoir entre 1 et 2 µg d'ADN). Ajouter ensuite 16 µL d'enhancer, vortexer le tout pendant 1 s et laisser à température ambiante pendant 3 min. Ajouter enfin 20 µL d'effectene. Vortexer pendant 10 s et laisser à température ambiante pendant 10 min. Puis ajouter 900 µL de milieu de culture DMEM complémenté* dans le mix en homogénéisant.

2. Récupération des cellules à transfecter

Pendant que le mix repose, on récupère les cellules. Pour cela, après deux rinçages au PBS, décoller les cellules du flacon de culture, à l'aide d'un mélange trypsine/EDTA (300 µL de trypsine repris dans 4,7 mL de milieu pour un flacon de culture de 25 cm^2).

3. Transfection

Prendre une plaque 6 puits. Par puits, ajouter dans l'ordre :
- 1 mL de milieu de culture
- 800 µL de cellules (dans le cas où le flacon de culture est confluent).
- le mix de transfection goutte à goutte. Remuer un peu.
- 2 mL de milieu de culture. Remuer de nouveau.

Placer ensuite la plaque dans l'incubateur 5% CO_2 et 37°C.
Changer le milieu de culture le lendemain.

* Le milieu de culture est constitué de DMEM + 10% Sérum de Veau Fœtal (SVF) décomplémenté et filtré + 1% Pénicilline/Streptomycine + 1% L-Glutamine.

Protocole expérimental pourun *coating* avec de la Poly-Alyl-Amine PAA

- Dilution 100x dans PBS des aliquots de PAA.
- Déposer 200 µL de la solution précédente dans chaque puits de labtech 8 puits.
- Laisser 30 min à 37°C.
- Effectuer trois rinçages au PBS après avoir enlevé les 200 µL de PAA dans chaque puits.
- Ne pas laisser sécher : laisser du PBS dans chaque puits en attendant de déposer les cellules.

ANNEXE III.2 : Electroporation

Préparation des milieux, dissection des structures et mise en culture de neurones primaires d'hippocampe d'embryons de rat.

1. Préparation des solutions

- Réaliser les différentes solutions selon le nombre de structures (cortex, striatum, hippocampe) qu'on cherche à récupérer. On utilise :
  - du milieu de dissociation (DM), un tampon salin
  - une solution de KyMg 10x (acide kynurénique 10 mM et MgCl2 100 mM)
  - une solution de papaïne (10 mg/mL)
  - une solution de cystéine (25,6 mg/ml)

Solutions	Pour une structure
DM KyMg	18 mL de DM + 2 mL de KyMg
Papaïne/Cystéine	400 µL de Papaïne +125 uL deCystéine +9 mL de DM + 1 mL de KyMg
inhibiteur de trypsine	100 mg de trypsine inhibitor (T9253, Sigma-Aldrich) + 9 mL de DM + 1 mL de KyMg
Opti-MEM Glucose	20 mL

- Ajouter goutte à goutte du NaOH à 1 M pour rendre les solutions moins acides. On observe un passage de la couleur orange à rose, due à la présence de rouge de phénol dans le DM. Filtrer dans de nouveaux tube de 50 mL, et placer les solutions à 37°C au bain marie.
- Préparation du milieu neurobasal enrichi pour 50 mL :

Neurobasal au réfrigérateur		48 mL
B27	2%	1 mL
Pénicilline/streptomycine	1%	500 µL
Glutamax	1%	500 µL

Filtrer dans un nouveau tube de 50 mL et placer le milieu à 4°C au réfrigérateur.
-Distribuer dans différents boites de Pétri les différentes solutions de lavage.
  - 2x grosses boîtes de Pétri Ø 10 cm avec PBS 1x : 2 x 18mL (pour les embryons)
  - 1x moyennes boîtes de Pétri Ø 6 cm avec DM-KyMg : 9mL (pour les têtes)
  - 2x petites boîtes de Pétri Ø 3,5 cm avec DM-KyMg : 3mL (pour chacune des structures).

2. Dissection du cerveau des embryons

- Compter 10 à 13 embryons par rate. Durée : environ 1h-1h30.
- Attention aux contaminations. Laver ses mains au savon. Désinfecter l'espace de la loupe binoculaire à l'éthanol 70%. Ne pas toucher la loupe avec les pinces.
- Retirer les embryons des sacs vitellins dans du PBS 1x puis les placer dans l'autre boite de Pétri contenant du PBS 1x. Dans celle-ci récupérer les têtes et évacuer le plus possible de sang. Enlever le crâne et transférer les cerveaux à disséquer dans la boite de Pétri contenant du DM-KyMg (boîtes de taille moyenne).
- Sous la loupe binoculaire, enlever les méninges et récupérer la structure d'intérêt. Puis transférer dans les plus petites boîtes de Pétri les structures désirées (dans notre cas le cortex).

3. Digestion enzymatique des structures

- Sous la hotte à flux laminaire ou PSM, environ 1h30.
- Transférer les structures dans des tubes stériles de 15 mL à l'aide d'une pipette pasteur stérile (1falcon/structure).Laisser sédimenter puis enlever le plus de milieu possible sans laisser les structures à sec.
- Faire deux digestions enzymatiques successives avec 5 mL de cystéine/papaïne pendant 10 min à 37°C. Ne pas oublier d'agiter par inversion du tube toutes les 2 min. Eliminer le surnageant.
- Faire 3 lavages avec 2 mL de DM pour éliminer la cystéine/papaïne. Laisser sédimenter les structures. Eliminer le surnageant.
- Faire deux digestions enzymatiques successives avec 5 mL d'inhibiteur de trypsine à 37°C pendant 7 min 30. Agiter toutes les 2 min par inversion du tube. Eliminer le surnageant.
- Faire 3 lavages avec 2 mL de milieu opti-MEM glucose pour éliminer l'inhibiteur. Laisser sédimenter les structures.

4. Dissociation mécanique des structures

- Ajouter 2 mL d'opti-MEM glucose dans chaque tube et faire des va-et-vient délicats 5 à 6 fois avec une pipette de 5 mL. Eviter de faire des bulles Laisser sédimenter les neurones environ 5-10 min. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube.
- Recommencer l'opération de « trituration » sur le culot cellulaire restant deux à trois fois jusqu'à ce qu'il n'y ait presque plus de culot.
- Regrouper les surnageants obtenus dans le même tube.

5. Mise en culture des neurones

Les neurones ainsi dissociés sont ensuite comptés et mis en culture dans l'opti-MEM glucose.
On les laisse 2 à 3 heures à l'incubateur avant de remplacer le milieu opti-MEM glucose par le milieu neurobasal enrichi.

Principe d'une électroporation :

On met en présence les neurones et l'ADN du plasmide à transfecter aux quantités souhaitées. Dans notre cas, nous avons utilisé les quantités suivantes :

- pour le contrôle BACE1-GFP seul 2 µg/µL+pcDNA (8 µg/µL)
- pour l'expérience de FRET BACE1-GFP (2 µg/µL) et APP-mCherry (8 µg/µL). pcDNA correspond à un plasmide « vide » pour que l'on ait les mêmes quantités d'ADN introduites dans l'expérience de contrôle et l'expérience de FRET.

On applique ensuite un choc électrique puis on met les cellules en culture.

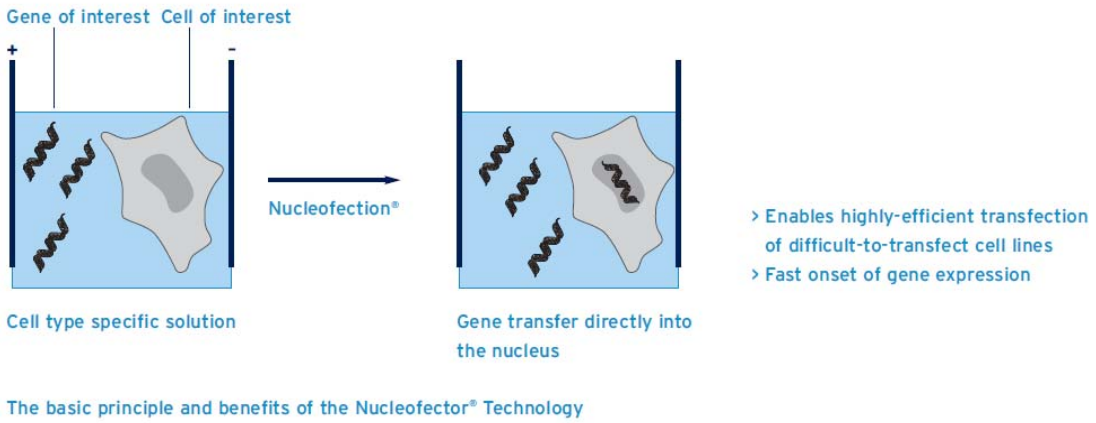


Fig.3.2.1: Schéma de principe d'une électroporation.
[http://www.lonzabio.com/].

ANNEXE IV.1 : Polariseurs

Schéma de principe du polariseur Glan Laser

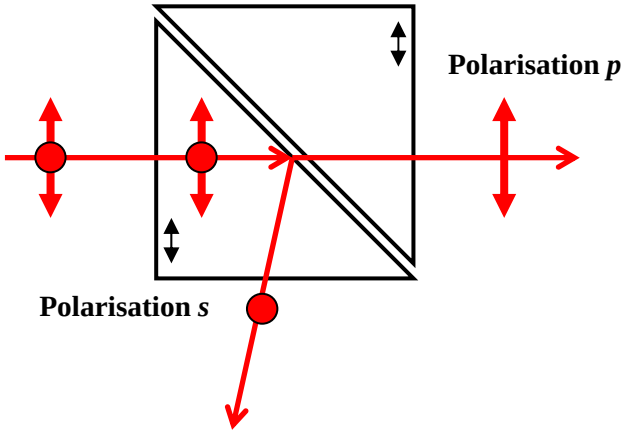


Fig.4.1.1 : Schéma du polariseur Glan Laser

Caractéristiques du cube séparateur de polarisation dans le *Dual View*

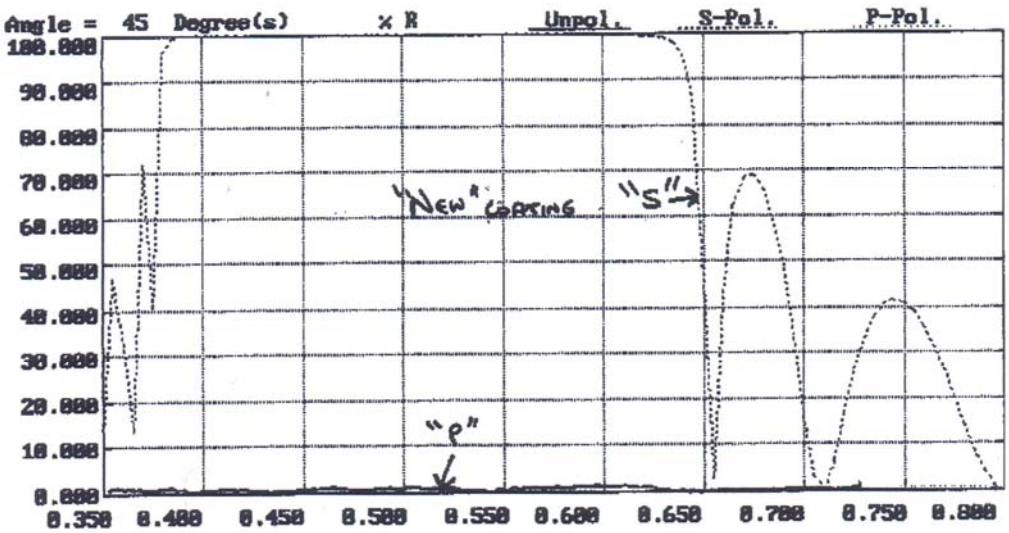


Fig.4.1.2 : Caractéristiques du cube séparateur de polarisation.

BIBLIOGRAPHIE

[1] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 2002.

[2] R. Bailey, A. Smith, and S. Nie, "Quantum dots in biology and medicine," *Physica E*, vol. 25, no. 1, pp. 1-12, Oct. 2004.

[3] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, and R. Y. Tsien, "The fluorescent toolbox for assessing protein location and function," *Science*, vol. 312, no. 5771, pp. 217-24, Apr. 2006.

[4] O. M. Subach et al., "Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe," *Chemistry & biology*, vol. 15, no. 10, pp. 1116-24, Oct. 2008.

[5] E. Betzig et al., "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science*, vol. 313, no. 5793, pp. 1642-5, Sep. 2006.

[6] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, "Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy," *Biophysical journal*, vol. 91, no. 11, pp. 4258-72, Dec. 2006.

[7] R. Mirabella, C. Franken, G. N.M., van der Krogt, T. Bisseling, and R. Geurts, "Use of the Fluorescent Timer DsRED-E5 as Reporter to Monitor Dynamics of Gene Activity in Plants," *Plant Physiology*, vol. 135, no. August, pp. 1879-1887, 2004.

[8] M. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope," *Optics letters*, vol. 22, no. 24, pp. 1905-7, Dec. 1997.

[9] M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 198, no. 2, pp. 82-87, May. 2000.

[10] M. G. L. Gustafsson, "Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 37, pp. 13081-6, Sep. 2005.

[11] S. Hell and E. H. K. Stelzer, "Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 9, no. 12, p. 2159, Dec. 1992.

[12] M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, and J. W. Sedat, "I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution," *Journal of Microscopy*, vol. 195, no. July, pp. 10-16, 1999.

[13] M. G. L. Gustafsson, "Sevenfold improvement of axial resolution in 3D wide-field microscopy using two objective lenses," in *Proceedings of SPIE*, 1995, vol. 2412, no. 1, pp. 147-156.

[14] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Optics letters*, vol. 19, no. 11, pp. 780-2, Jun. 1994.

[15] D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup, and S. W. Hell, "A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution," *Journal of microscopy*, vol. 236, no. 1, pp. 35-43, Oct. 2009.

[16] R. Schmidt, C. A. Wurm, S. Jakobs, J. Engelhardt, A. Egner, and S. W. Hell, “Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells,” *Nature Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 539-544, 2008.

[17] K. I. Willig, R. R. Kellner, R. Medda, B. Hein, S. Jakobs, and S. W. Hell, “Nanoscale resolution in GFP-based microscopy,” *Nature Methods*, vol. 3, no. 9, pp. 721-723, 2006.

[18] M. Edidin, “Near-field scanning optical microscopy, a siren call to biology,” *Traffic*, vol. 2, no. 11, pp. 797-803, Nov. 2001.

[19] T. J. Gould, J. R. Myers, and J. Bewersdorf, “Total internal reflection STED microscopy,” *Optics express*, vol. 19, no. 14, pp. 13351-7, Jul. 2011.

[20] H. Shroff et al., “Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes,” *PNAS*, vol. 104, no. 51, pp. 20308-13, Dec. 2007.

[21] T. Ruckstuhl, J. Enderlein, S. Jung, and S. Seeger, “Forbidden light detection from single molecules,” *Analytical chemistry*, vol. 72, no. 9, pp. 2117-23, May. 2000.

[22] E. Fort and S. Grésillon, “Surface enhanced fluorescence,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 41, no. 1, p. 013001, Jan. 2008.

[23] D. Axelrod, “Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology,” *Traffic*, no. 2, pp. 764-774, Jan. 2001.

[24] T. Ruckstuhl and S. Seeger, “Confocal total-internal-reflection fluorescence microscopy with a high-aperture parabolic mirror lens,” *Applied Optics*, vol. 42, no. 16, pp. 3277-3283, 2003.

[25] T. Ruckstuhl and D. Verdes, “Supercritical Angle Fluorescence (SAF) microscopy,” *Optics express*, vol. 12, no. 18, pp. 4246-54, Sep. 2004.

[26] E. Auksorius et al., “Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging,” *Optics Letters*, vol. 33, no. 2, p. 113, Jan. 2008.

[27] P. Blandin et al., “Time-gated total internal reflection fluorescence microscopy with a supercontinuum excitation source,” *Applied Optics*, vol. 48, no. 3, pp. 553-559, 2009.

[28] F. Festy, S. M. Ameer-Beg, T. Ng, and K. Suhling, “Imaging proteins in vivo using fluorescence lifetime microscopy,” *Molecular bioSystems*, vol. 3, no. 6, pp. 381-91, Jun. 2007.

[29] P. J. Verveer and P. I. H. Bastiaens, “Quantitative microscopy and systems biology: seeing the whole picture,” *Histochemistry and cell biology*, vol. 130, no. 5, pp. 833-43, Nov. 2008.

[30] J. A. Levitt, D. R. Matthews, S. M. Ameer-Beg, and K. Suhling, “Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology,” *Current opinion in biotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 28-36, Feb. 2009.

[31] T. Nakabayashi, H.-P. Wang, M. Kinjo, and N. Ohta, “Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements,” *Photochemical & photobiological sciences*, vol. 7, no. 6, pp. 668-70, Jul. 2008.

[32] C. Tregidgo, J. A. Levitt, and K. Suhling, “Effect of refractive index on the fluorescence lifetime of green fluorescent protein,” *Journal of biomedical optics*, vol. 13, no. 3, p. 031218, 2008.

[33] J. A. Levitt, M. K. Kuimova, G. Yahioglu, P.-H. Chung, K. Suhling, and D. Phillips, “Membrane-Bound Molecular Rotors Measure Viscosity in Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, no. 27, pp. 11634-11642, Jul. 2009.

[34] N. P. Galletly et al., “Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin,” *The British journal of dermatology*, vol. 159, no. 1, pp. 152-61, Jul. 2008.

[35] H. Wallrabe and A. Periasamy, “Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy,” *Current opinion in biotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 19-27, Feb. 2005.

[36] S. E. D. Webb et al., “A wide-field time-domain fluorescence lifetime imaging microscope with optical sectioning,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 73, no. 4, p. 1898, 2002.

[37] W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques* , Springer. 2005.

[38] I. Bugiel, K. Konig, and H. Wabnitz, “Investigation of cells by Fluorescence Laser Scaning Microscopy with Subnanosecond Time Resolution,” *Lasers in the Life Sciences*, vol. 3, pp. 47-53, 1989.

[39] E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, Q. Ruan, and N. Barry, “Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods,” *Journal of biomedical optics*, vol. 8, no. 3, pp. 381-90, Jul. 2003.

[40] C. Niclass, C. Favi, T. Kluter, M. Gersbach, and E. Charbon, “A 128×128 Single-Photon Imager with on-Chip Column-Level 10b Time-to-Digital Converter Array Capable of 97ps Resolution,” *2008 IEEE International Solid-State Circuits Conference - Digest of Technical Papers*, pp. 44-594, Feb. 2008.

[41] D. M. Grant et al., “High speed optically sectioned fluorescence lifetime imaging permits study of live cell signaling events,” *Optics express*, vol. 15, no. 24, pp. 15656-73, Nov. 2007.

[42] A. Deniset-Besseau, “Imagerie 3D résolue en temps pour l’aide au diagnostic médical: développement d’un système de microsccopie de fluorescence multipoints sous excitation à deux photons,” Université Paris XI, 2008.

[43] K. Dowling, “2-D fluorescence lifetime imaging using a time-gated image intensifier,” *Optics Communications*, vol. 135, no. 1-3, pp. 27-31, Feb. 1997.

[44] S. E. D. Webb, “Development and Application of Widefield Fluorescence Lifetime Imaging,” University of London, 2003.

[45] A. V. Agronskaia, L. Tertoolen, and H. C. Gerritsen, “High frame rate fluorescence lifetime imaging,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 36, no. 14, pp. 1655-1662, Jul. 2003.

[46] R. V. Krishnan, H. Saitoh, H. Terada, V. E. Centonze, and B. Herman, “Development of a multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, no. 5, p. 2714, 2003.

[47] E. Gaviola, “Ein Fluorometer, Apparat zur Messung von Fluoreszenzabklingungszeiten,” *Zeitschrift für Physik*, vol. 42, no. 11-12, pp. 853-861, May. 1927.

[48] R. Cubeddu, D. Comelli, C. D’Andrea, P. Taroni, and G. Valentini, “Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 35, no. 9, p. R61-R76, May. 2002.

[49] P. C. Schneider and R. M. Clegg, “Rapid acquisition, analysis, and display of fluorescence lifetime-resolved images for real-time applications,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 68, no. 11, p. 4107, 1997.

[50] G. T. Kennedy et al., “Fluorescence lifetime imaging using light emitting diodes,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 41, no. 9, May. 2008.

[51] T. W. J. Gadella Jr., T. M. Jovin, and R. M. Clegg, “Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale,” *Biophysical Chemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 221-239, Dec. 1993.

[52] J. Tellinghuisen, P. M. Goodwln, W. P. Ambrose, J. C. Martin, and R. A. Kellert, “Analysis of Fluorescence Lifetime Data for Single Rhodamine Molecules in Flowing Sample Streams,” *Analytical chemistry*, vol. 66, no. 1, pp. 64-72, 1994.

[53] A. Rück, F. Dolp, R. Steiner, C. Steinmetz, B. von Einem, and C. A. F. von Arnim, “SLIM for multispectral FRET imaging,” in *Proceedings of SPIE*, 2008, vol. 6860, no. 1.

[54] W. Becker, A. Bergmann, and C. Biskup, “Multispectral Fluorescence Lifetime Imaging by TCSPC,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 70, pp. 403-409, 2007.

[55] C. Spriet et al., “Correlated fluorescence lifetime and spectral measurements in living cells,” *Microscopy research and technique*, vol. 70, no. 2, pp. 85-94, Feb. 2007.

[56] G. I. Redford and R. M. Clegg, “Polar plot representation for frequency-domain analysis of fluorescence lifetimes,” *Journal of fluorescence*, vol. 15, no. 5, pp. 805-15, Sep. 2005.

[57] M. A. Digman, V. R. Caiolfa, M. Zamai, and E. Gratton, “The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis,” *Biophysical journal*, vol. 94, no. 2, pp. L14-6, Jan. 2008.

[58] S. Padilla-Parra, N. Audugé, M. Coppey-Moisan, and M. Tramier, “Quantitative FRET analysis by fast acquisition time domain FLIM at high spatial resolution in living cells,” *Biophysical journal*, vol. 95, no. 6, pp. 2976-88, Oct. 2008.

[59] S. Padilla-Parra, N. Audugé, H. Lalucque, J.-C. Mevel, M. Coppey-Moisan, and M. Tramier, “Quantitative comparison of different fluorescent protein couples for fast FRET-FLIM acquisition,” *Biophysical journal*, vol. 97, no. 8, pp. 2368-76, Oct. 2009.

[60] T. Forster, “Energiewanderung und Fluoreszenz,” *Die Naturwissenschaften*, vol. 33, no. 6, pp. 166-175, 1946.

[61] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second. Kluwer Academic /Plenum publishers, 1999.

[62] R. M. Clegg, “Fluorescence Resonance Energy TRansfer,” in *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*, X. F. Wang and B. Herman, Eds. Chicester: John Wiley & Sons, Inc, 1996, pp. 179-252.

[63] M. Tramier et al., “Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells,” *Biophysical journal*, vol. 83, no. 6, pp. 3570-3577, 2002.

[64] M. A. Rizzo, G. Springer, K. Segawa, W. R. Zipfel, and D. W. Piston, “Optimization of pairings and detection conditions for measurement of FRET between cyan and yellow fluorescent proteins,” *Microscopy and microanalysis*, vol. 12, no. 3, pp. 238-54, Jun. 2006.

[65] C. Poujol, *Atelier de microscopie confocale*. 2008.

[66] Y. Gu, W. L. Di, D. P. Kelsell, and D. Zicha, “Quantitative fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement with acceptor photobleaching and spectral unmixing,” *Journal of microscopy*, vol. 215, no. 2, pp. 162-73, Aug. 2004.

[67] P. I. Bastiaens and T. M. Jovin, “Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 16, pp. 8407-12, Aug. 1996.

[68] Z. Xia and J. Rao, “Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer,” *Current opinion in biotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 37-44, Feb. 2009.

[69] M.-K. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, and J. Rao, “Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging,” *Nature biotechnology*, vol. 24, no. 3, pp. 339-43, Mar. 2006.

[70] S. Angers et al., “Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET),” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 7, pp. 3684-9, Mar. 2000.

[71] K. D. G. Pfleger and K. A. Eidne, “Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET),” *Nature Methods*, vol. 3, no. 3, pp. 165-174, 2006.

[72] T. K. Kerppola, “Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells,” *Nature protocols*, vol. 1, no. 3, pp. 1278-86, Jan. 2006.

[73] P. Schwille and E. Haustein, “Fluorescence Correlation Spectroscopy. An Introduction to its Concepts and Applications,” *Spectroscopy*, vol. 94, no. 3, pp. 1-33, 2009.

[74] J. Mertz, C. Xu, and W. W. Webb, “Single-molecule detection by two-photon-excited fluorescence,” *Optics Letters*, vol. 20, no. 24, p. 2532, Dec. 1995.

[75] S. A. Kim, K. G. Heinze, and P. Schwille, “Fluorescence correlation spectroscopy in living cells,” *Nature methods*, vol. 4, no. 11, pp. 963-73, Nov. 2007.

[76] A. J. García-Sáez and P. Schwille, “Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions,” *Methods*, vol. 46, no. 2, pp. 116-22, Oct. 2008.

[77] T. Weidemann, M. Wachsmuth, M. Tewes, K. Rippe, and J. Langowski, “Analysis of ligand binding by two-colour fluorescence crosscorrelation spectroscopy,” *Single Mol.* , vol. 3, pp. 49–61, 2002.

[78] E. Margeat et al., “The human estrogen receptor alpha dimer binds a single SRC-1 coactivator molecule with an affinity dictated by agonist structure,” *Journal of molecular biology*, vol. 306, no. 3, pp. 433-42, Feb. 2001.

[79] M. Kinjo and R. Rigler, “Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy,” *Nucleic Acids Research*, vol. 23, no. 10, pp. 1795-1799, 1995.

[80] A. Pramanik and R. Rigler, “Ligand-receptor interactions in the membrane of cultured cells monitored by fluorescence correlation spectroscopy,” *Biological chemistry*, vol. 382, no. 3, pp. 371-8, Mar. 2001.

[81] C. Marquer et al., “Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis,” *The FASEB journal*, pp. 1-11, Jan. 2011.

[82] P. Schwille, F. J. Meyer-Almes, and R. Rigler, “Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution,” *Biophysical journal*, vol. 72, no. 4, pp. 1878-86, Apr. 1997.

[83] P. Liu et al., “Investigation of the dimerization of proteins from the epidermal growth factor receptor family by single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy,” *Biophysical journal*, vol. 93, no. 2, pp. 684-98, Jul. 2007.

[84] K. Saito, I. Wada, M. Tamura, and M. Kinjo, “Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 324, no. 2, pp. 849-54, Nov. 2004.

[85] Magde, D, E. Elson, and W. W. Webb, “Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 29, pp. 705–708, 1972.

[86] K. Bacia, S. A. Kim, and P. Schwille, “Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells,” *Nature methods*, vol. 3, no. 2, pp. 83-9, Feb. 2006.

[87] K. G. Heinze, A. Koltermann, and P. Schwille, “Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 19, pp. 10377-82, Sep. 2000.

[88] L. C. Hwang and T. Wohland, “Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy using single laser wavelength excitation,” *Chemphyschem*, vol. 5, no. 4, pp. 549-51, Apr. 2004.

[89] T. Kogure, S. Karasawa, T. Araki, K. Saito, M. Kinjo, and A. Miyawaki, “A fluorescent variant of a protein from the stony coral Montipora facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy,” *Nature biotechnology*, vol. 24, no. 5, pp. 577-81, May. 2006.

[90] Y. Ohsugi, K. Saito, M. Tamura, and M. Kinjo, “Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy,” *Biophysical journal*, vol. 91, no. 9, pp. 3456-64, Nov. 2006.

[91] D. M. Jameson, J. A. Ross, and J. P. Albanesi, “Fluorescence fluctuation spectroscopy: ushering in a new age of enlightenment for cellular dynamics,” *Biophysical reviews*, vol. 1, no. 3, pp. 105-118, Sep. 2009.

[92] M. Tramier and M. Coppey-Moisan, “Fluorescence anisotropy imaging microscopy for homo-FRET in living cells,” *Methods Cell Biol*, vol. 85, pp. 395-414, 2008.

[93] M. A. Rizzo and D. W. Piston, “High-contrast imaging of fluorescent protein FRET by fluorescence polarization microscopy,” *Biophysical journal*, vol. 88, no. 2, pp. L14-6, Feb. 2005.

[94] Y. Chen, J. D. Müller, P. T. So, and E. Gratton, “The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy,” *Biophysical journal*, vol. 77, no. 1, pp. 553-67, Jul. 1999.

[95] Y. Chen, L.-N. Wei, and J. D. Müller, “Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 26, pp. 15492-7, Dec. 2003.

[96] K. Bacia and P. Schwille, “A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy,” *Methods*, vol. 29, no. 1, pp. 74-85, Jan. 2003.

[97] Y. Chen, M. Tekmen, L. Hillesheim, J. Skinner, B. Wu, and J. D. Müller, “Dual-color photon-counting histogram,” *Biophysical journal*, vol. 88, no. 3, pp. 2177-92, Mar. 2005.

[98] L. N. Hillesheim, Y. Chen, and J. D. Müller, “Dual-color photon counting histogram analysis of mRFP1 and EGFP in living cells,” *Biophysical journal*, vol. 91, no. 11, pp. 4273-84, Dec. 2006.

[99] D. Toomre and D. J. Manstein, “Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy,” *Trends in cell biology*, vol. 11, no. 7, pp. 298-303, Jul. 2001.

[100] M. Oheim and F. Schapper, “Non-linear evanescent-field imaging,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 38, no. 10, p. R185-R197, May. 2005.

[101] D. Axelrod, “Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 89, no. 1, pp. 141-145, Apr. 1981.

[102] Hecht, *Optique*, 4th ed. 2002.

[103] M. Born and E. Wolf, *Principles of optics*, Pergamon P. 1975.

[104] J. R. Abney, B. A. Scalettar, and N. L. Thompson, “Evanescent interference patterns for fluorescence microscopy,” *Biophysical journal*, vol. 61, no. 2, pp. 542-52, Feb. 1992.

[105] L. Józefowski, J. Fiutowski, T. Kawalec, and H.-G. Rubahn, “Direct measurement of the evanescent-wave polarization state,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 24, no. 3, p. 624, 2007.

[106] D. Axelrod, T. P. Burghardt, and N. L. Thompson, “Total internal reflection fluorescence,” *Annual review of biophysics and bioengineering*, vol. 13, no. 17, pp. 247-68, Jan. 1984.

[107] T. Vo-Dinh and B. R. Masters, “Biomedical Photonics Handbook,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 9, no. 5, p. 1110, Sep. 2004.

[108] M. van ’t Hoff, V. de Sars, and M. Oheim, “A programmable light engine for quantitative single molecule TIRF and HILO imaging,” *Optics express*, vol. 16, no. 22, pp. 18495-504, Oct. 2008.

[109] P. Blandin, “Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps: applications biomédicales,” Université Paris XI, 2008.

[110] E. H. Hellen, D. Axelrod, and A. Arbor, “Fluorescence emission at dielectric and metal-film interfaces,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 4, no. 3, pp. 337-350, 1987.

[111] Y. Goulam Houssen, “Plasmonique appliquée à l’ingénierie des processus de fluorescence en biophotonique,” Université Paris Diderot Paris 7, 2009.

[112] A. L. Mattheyses and D. Axelrod, “Direct measurement of the evanescent field profile produced by objective-based total internal reflection fluorescence,” *Journal of biomedical optics*, vol. 11, no. 1, p. 014006, Jan. 2006.

[113] W. L. Barnes, A. Dereux, and T. W. Ebbesen, “Surface plasmon subwavelength optics,” *Nature*, vol. 424, no. 6950, pp. 824-30, Aug. 2003.

[114] R. Carminati, “Cours de l’Institut d'Optique: Microscopies de champ proche. Concept de l'optique de champ proche,” 2008.

[115] H. Choumane et al., “Double interference fluorescence enhancement from reflective slides: Application to bicolor microarrays,” *Applied Physics Letters*, vol. 87, no. 3, p. 031102, 2005.

[116] J. Enderlein and T. Ruckstuhl, “The efficiency of surface-plasmon coupled emission for sensitive fluorescence detection,” *Optics Express*, vol. 13, no. 22, p. 8855, 2005.

[117] I. Gryczynski, “Radiative decay engineering 4. Experimental studies of surface plasmon-coupled directional emission,” *Analytical Biochemistry*, vol. 324, no. 2, pp. 170-182, Jan. 2004.

[118] T. P. Burghardt, J. E. Charlesworth, M. F. Halstead, J. E. Tarara, and K. Ajtai, “In situ fluorescent protein imaging with metal film-enhanced total internal reflection microscopy,” *Biophysical journal*, vol. 90, no. 12, pp. 4662-71, Jun. 2006.

[119] J. Borejdo, Z. Gryczynski, N. Calander, P. Muthu, and I. Gryczynski, “Application of surface plasmon coupled emission to study of muscle,” *Biophysical journal*, vol. 91, no. 7, pp. 2626-35, Oct. 2006.

[120] N. I. Cade, G. Fruhwirth, S. J. Archibald, T. Ng, and D. Richards, “A cellular screening assay using analysis of metal-modified fluorescence lifetime,” *Biophysical journal*, vol. 98, no. 11, pp. 2752-7, Jul. 2010.

[121] E. L. Moal, E. Fort, S. Lévêque-Fort, F. P. Cordelières, M.-P. Fontaine-Aupart, and C. Ricolleau, “Enhanced fluorescence cell imaging with metal-coated slides,” *Biophysical journal*, vol. 92, no. 6, pp. 2150-61, Mar. 2007.

[122] A. Wimo and M. Prince, *World Alzheimer Report 2010 The Global Economic Impact of Dementia*. 2010.

[123] Inserm, “Site Inserm/ Neuroscienes, sciences cognitives, neurologie, psychiatrie/ Alzheimer.” [Online]. Available: http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer.

[124] Inserm, *Maladie d’Alzheimer enjeux scientifiques, médicaux et sociaux*. 2007.

[125] R. Sherrington et al., “Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer’s disease,” *Science*, vol. 375, pp. 754 - 760, 1995.

[126] W. J. Strittmatter et al., “Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to -Amyloid and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 90, no. 5, pp. 1977-1981, Mar. 1993.

[127] L. Fratiglioni, S. Paillard-Borg, and B. Winblad, “An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia,” *Lancet neurology*, vol. 3, no. 6, pp. 343-53, Jun. 2004.

[128] T. Mori et al., “Cholesterol Accumulates in Senile Plaques of Alzheimer Disease Patients and in Transgenic APPsw Mice,” *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 60, no. 8, pp. 778–785, 2001.

[129] M. Panchal et al., “Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer’s disease senile plaques as assessed by mass spectrometry,” *Journal of lipid research*, vol. 51, no. 3, pp. 598-605, Mar. 2010.

[130] T. C. Dickson, H. L. Saunders, and J. C. Vickers, “Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer’s disease,” *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 23, no. 6, pp. 483-491, Dec. 1997.

[131] C. Duyckaerts, B. Delatour, and M.-C. Potier, “Classification and basic pathology of Alzheimer disease,” *Acta neuropathologica*, vol. 118, no. 1, pp. 5-36, Jul. 2009.

[132] O. M. Andersen and T. E. Willnow, “Lipoprotein receptors in Alzheimer’s disease,” *Trends in neurosciences*, vol. 29, no. 12, pp. 687-94, Dec. 2006.

[133] G. Bu, “Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer’s disease: pathways, pathogenesis and therapy,” *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 10, no. 5, pp. 333-44, May. 2009.

[134] W. J. Strittmatter et al., “Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 17, pp. 8098-102, Sep. 1993.

[135] H. Xiong et al., “Cholesterol retention in Alzheimer’s brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production,” *Neurobiology of disease*, vol. 29, no. 3, pp. 422-37, Mar. 2008.

[136] M. Simons, P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C. G. Dotti, and K. Simons, “Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 11, pp. 6460-4, May. 1998.

[137] A. Schneider et al., “Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons,” *The Journal of neuroscience*, vol. 28, no. 11, pp. 2874-82, Mar. 2008.

[138] A. Subtil, I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen, and T. E. McGraw, “Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 12, pp. 6775-80, Jun. 1999.

[139] C. A. F. von Arnim et al., “Impact of cholesterol level upon APP and BACE proximity and APP cleavage,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 370, no. 2, pp. 207-12, May. 2008.

[140] J.-C. Cossec et al., “Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1801, no. 8, pp. 846-52, Aug. 2010.

[141] D. A. Brown and E. London, “Functions of lipid rafts in biological membranes,” *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 14, pp. 111-36, Jan. 1998.

[142] D. Lingwood and K. Simons, “Lipid rafts as a membrane-organizing principle,” *Science*, vol. 327, no. 5961, pp. 46-50, Jan. 2010.

[143] L. Rajendran and K. Simons, “Lipid rafts and membrane dynamics,” *Journal of cell science*, vol. 118, no. 6, pp. 1099-102, Mar. 2005.

[144] J. A. Allen, R. A. Halverson-Tamboli, and M. M. Rasenick, “Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling,” *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 8, no. 2, pp. 128-40, Feb. 2007.

[145] A. Pralle, “Sphingolipid-Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 148, no. 5, pp. 997-1008, Mar. 2000.

[146] J.-C. Cossec, C. Marquer, M. Panchal, A. N. Lazar, C. Duyckaerts, and M.-C. Potier, “Cholesterol changes in Alzheimer’s disease: methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1801, no. 8, pp. 839-45, Aug. 2010.

[147] L. Rajendran et al., “Efficient inhibition of the Alzheimer’s disease beta-secretase by membrane targeting,” *Science*, vol. 320, no. 5875, pp. 520-3, Apr. 2008.

[148] M. O. W. Grimm et al., “Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin,” *Nature cell biology*, vol. 7, no. 11, pp. 1118-23, Nov. 2005.

[149] S. Scheuermann et al., “Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer’s disease,” *J Biol Chem*, vol. 276, no. 36, pp. 33923-33929, 2001.

[150] L. Richter et al., “Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 107, no. 33, pp. 14597-14602, 2010.

[151] L.-M. Munter et al., “GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42,” *The EMBO journal*, vol. 26, no. 6, pp. 1702-12, Mar. 2007.

[152] S. Eggert, B. Midthune, B. Cottrell, and E. H. Koo, “Induced dimerization of the amyloid precursor protein leads to decreased amyloid-beta protein production,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 42, pp. 28943-52, Oct. 2009.

[153] P. Kienlen-Campard et al., “Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs,” *J Biol Chem*, vol. 283, no. 12, pp. 7733-7744, 2008.

[154] S. S. Vogel, C. Thaler, P. S. Blank, and S. V. Koushik, “Time Resolved Fluorescence Anisotropy,” in *FLIM microscopy in Biology and Medicine*, 1st ed., vol. 90, no. 22, A. Periasamy and R. M. Clegg, Eds. London: Taylor & Francis (CRC Group), 2008, pp. 245-288.

[155] J. Siegel et al., “Wide-field time-resolved fluorescence anisotropy imaging (TR-FAIM): Imaging the rotational mobility of a fluorophore,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, no. 1, pp. 182-192, 2003.

[156] A. H. A. Clayton, Q. S. Hanley, D. J. Arndt-Jovin, V. Subramaniam, and T. M. Jovin, “Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rFLIM),” *Biophysical journal*, vol. 83, no. 3, pp. 1631-49, Sep. 2002.

[157] D. S. Lidke et al., “Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET),” *Biochemical Society transactions*, vol. 31, no. 5, pp. 1020-7, Oct. 2003.

[158] I. Gautier et al., “Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins,” *Biophys J*, vol. 80, no. 6, pp. 3000-3008, Jun. 2001.

[159] K. Suhling, D. M. Davis, and D. Phillips, “The Influence of Solvent Viscosity on the Fluorescence Decay and Time-Resolved Anisotropy of Green Fluorescent Protein,” *Journal of Fluorescence*, vol. 12, no. 1, pp. 91-95-95, 2002.

[160] C. Thaler, S. V. Koushik, H. L. Puhl, P. S. Blank, and S. S. Vogel, “Structural rearrangement of CaMKIIα catalytic domains encodes activation,” *PNAS*, vol. 106, no. 15, pp. 6369-6374, 2009.

[161] E. K. L. Yeow and A. H. A. Clayton, “Enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-FRET spectroscopy and microscopy: theory and application,” *Biophysical journal*, vol. 92, no. 9, pp. 3098-104, May. 2007.

[162] A. N. Bader et al., “Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering,” *Chemphyschem*, vol. 12, no. 3, pp. 475-83, Feb. 2011.

[163] C. Marquer et al., “Influence of MT7 toxin on the oligomerization state of the M1 muscarinic receptor,” *Biology of the cell*, vol. 102, no. 7, pp. 409-20, Jul. 2010.

[164] D. Axelrod, “Fluorescence polarization microscopy,” in *Methods in Cell Biology. Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture Part B. Quantitative Fluorescence Microscopy—Imaging and Spectroscopy*, vol. 30, Elsevier, 1989, pp. 333-352.

[165] W. Becker, *The bh TCSPC Handbook*. Becker & Hickl GmbH, 2008.

[166] J. J. Fisz, “Another treatment of fluorescence polarization microspectroscopy and imaging,” *The journal of physical chemistry. A*, vol. 113, no. 15, pp. 3505-16, Apr. 2009.

[167] J. J. Fisz, “Fluorescence polarization spectroscopy at combined high-aperture excitation and detection: application to one-photon-excitation fluorescence microscopy,” *The journal of physical chemistry. A*, vol. 111, no. 35, pp. 8606-21, Sep. 2007.

[168] M. Koshioka, K. Sasaki, and H. Masuhara, “Time-Dependent Fluorescence Depolarization Analysis in Three-Dimensional Microspectroscopy,” *Applied Spectroscopy*, vol. 49, no. 2, pp. 224-228, Feb. 1995.

[169] T. M. Godfrey, J. C. Kern, M. E. Hanke, S. J.B., and W. C.H., *Glycerol*. New York: New York Publishing Corporation, 1953.

[170] K. Suhling et al., “Time-resolved fluorescence anisotropy imaging applied to live cells,” *Optics letters*, vol. 29, no. 6, pp. 584-6, Mar. 2004.

[171] K. Yum, S. Na, Y. Xiang, N. Wang, and M.-F. Yu, “Mechanochemical delivery and dynamic tracking of fluorescent quantum dots in the cytoplasm and nucleus of living cells,” *Nano letters*, vol. 9, no. 5, pp. 2193-8, May. 2009.

[172] T. A. Smith, M. L. Gee, C. A. Scholes, C. D. Geddes, and J. R. Lakowicz, “Time-resolved evanescent wave-induced fluorescence anisotropy measurements,” in *Reviews in Fluorescence* , vol. 2005, C. D. Geddes and J. R. Lakowicz, Eds. Boston, MA: Springer US, 2005, pp. 245-270.

[173] A. N. Bader, E. G. Hofman, P. M. van Bergen En Henegouwen, and H. C. Gerritsen, “Imaging of protein cluster sizes by means of confocal time-gated fluorescence anisotropy microscopy,” *Opt Express*, vol. 15, no. 11, pp. 6934-6945, 2007.