



Observation de l'activité traductionnelle d'un ribosome unique par microscopie de fluorescence couplée à un système microfluidique

David Dulin

► To cite this version:

David Dulin. Observation de l'activité traductionnelle d'un ribosome unique par microscopie de fluorescence couplée à un système microfluidique. Physique [physics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT : . tel-00538401

HAL Id: tel-00538401

<https://pastel.hal.science/tel-00538401>

Submitted on 23 Nov 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS XI
INSTITUT D'OPTIQUE PARISTECH

LABORATOIRE CHARLES FABRY

Groupe d'Optique Atomique

THESE

pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences

de l'Université Paris XI

Présentée par
David DULIN

Observation de l'activité
traductionnelle d'un ribosome unique
par microscopie de fluorescence couplée
à un système microfluidique

Soutenue publiquement le 16 octobre 2009 devant le jury composé de

Président : Marie-Pierre FONTAINE-AUPART
Rapporteurs : Laurent COGNET
Catherine ROYER
Examineurs : Dominique FOURMY
Karen PERRONET
Directrice : Nathalie WESTBROOK
Invité : Koen VISSCHER

Remerciements

J'ai effectué ma thèse dans le groupe Optique Atomique, du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique. Je remercie Pierre Chavel, Directeur du LCFIO, de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie Jean-Louis Martin, directeur de l'Institut d'Optique Graduate School, pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail, ainsi que pour le temps qu'il m'a accordé pour me conseiller.

Je remercie Alain Aspect de m'avoir accueilli dans son groupe, et de m'avoir fait confiance pour travailler sur ce projet novateur. Je remercie Nathalie Westbrook d'avoir dirigé ma thèse. Elle m'a permis d'acquérir des compétences en optique, et m'a laissé la liberté d'exprimer et d'appliquer mes idées pendant cette thèse. Je la remercie aussi de m'avoir aidé à faire de l'enseignement au sein de l'Institut d'Optique Graduate School, grâce auquel j'ai pu m'enrichir scientifiquement.

Je remercie Laurent Cagnet et Catherine Royer d'avoir accepté de rapporter ma thèse. J'ai eu le plaisir de rencontrer Laurent lors de mes études à Bordeaux. Sa fraîcheur et son enthousiasme pour parler de son travail de recherche ont été déterminants dans ma volonté de faire de la biophysique. De plus, les discussions sur ma thèse que j'ai eues avec lui ont été enrichissantes. Je ne connaissais pas Catherine Royer avant la soutenance, et j'ai beaucoup apprécié l'intérêt qu'elle a porté à mon travail à travers les questions précises posées pendant la soutenance.

Je remercie Marie-Pierre Fontaine-Aupart d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de l'avoir présidé. Je remercie aussi Dominique Fourmy, Karen Perronet et Koen Visscher d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je vais maintenant remercier les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, en commençant par mon équipe à l'Institut d'Optique.

Pendant ces trois ans, j'ai eu le plaisir de travailler avec Karen Perronet, qui m'a encadré "sur le terrain". Elle m'a donné beaucoup de son temps pour combler mes lacunes, et cela avec beaucoup de patience. Elle a été essentielle au bon déroulement de ma thèse, que ce soit par ses qualités scientifiques ou par son encadrement. Elle a aussi su canaliser mon travail pour éviter que je me disperse. Je veux aussi la remercier pour ses grandes qualités humaines, qui ont été tout autant essentielles. Je vais regretter le café de 9h30 où on conversait sur les déboires expérimentaux de la veille... Je lui souhaite toute la réussite possible pour la suite.

J'envoie un grand merci à Antoine Le Gall qui prend ma suite dans ce projet expérimental. J'ai grandement apprécié de travailler avec lui la dernière année de ma thèse, et pas seulement pour ses qualités scientifiques, mais aussi pour les bons moments d'humour et de Naruto qu'on a pu partager très tard, autour d'un verre de polymix... Il a aussi su "apprécier" avec patience la musique que je lui imposais... Je suis certain que la manipe progressera grandement avec lui et qu'il aura de nombreux résultats bientôt (dépêche-toi, j'attends!).

Je remercie Philippe Bouyer du soutien qu'il m'a toujours manifesté, et des bons conseils

qu'il a pu me donner. Son enthousiasme permanent a permis de garder le cap, même dans la tempête ribosomale.

Je remercie finalement Koen Visscher, professeur à Tucson, qui est venu travailler dans notre équipe pendant les 6 derniers mois de ma thèse. J'ai beaucoup apprécié sa fraîcheur et son enthousiasme, ainsi que ses explications toujours claires. Ses nombreuses idées et sa clairvoyance ont été d'un grand secours pendant ces derniers mois, notamment pendant mes dernières manipes.

Je vais maintenant remercier les personnes de l'ICSN avec qui j'ai collaboré.

J'ai eu l'occasion de travailler avec différentes personnes de l'équipe de Dominique Fourmy et Satoko Yoshizawa de l'ICSN pendant ces 3 années. Tout d'abord, je pense à Nicolas Soler, qui a partagé longtemps mes nuits au laboratoire à tenter d'observer l'activité de nos coriaces ribosomes. Il a toujours répondu présent à la répétition des journées de quinze heures, et malgré les résultats souvent négatifs. Sa bonne humeur, et son optimisme ont permis de garder une volonté intacte pendant ces trois ans. Il m'a aussi beaucoup appris, notamment pendant le mois et demi que nous avons passé ensemble à l'ICSN à m'apprendre les bases de la biochimie. Je lui souhaite plein de réussite pendant son post-doc à Cambridge.

Je remercie aussi Cyril que j'ai cotoyé pendant ma première année de thèse, qui, entre deux manipes, avait toujours le bon mot pour nous mettre de bonne humeur.

Je remercie grandement Satoko et Dominique qui nous ont permis de réaliser ces travaux. Grâce à eux, j'ai beaucoup appris sur le ribosome et sur comment réaliser des expériences de biochimie. J'ai eu beaucoup de plaisir à collaborer avec eux, et j'ai apprécié notamment leur grande disponibilité pour discuter de la mise au point des expériences, que ce soit directement ou par Skype !

Je souhaite enfin remercier les personnes de l'ICSN ou du CGM qui m'ont aidé : Damjana (et tes paniers repas...), Laetitia, Sophie, Vanessa...

Je remercie aussi les membres de MacSyBio, et notamment Jolanda Spadavecchia, qui nous ont aidés à la mise au point de la chimie de surface.

Je remercie aussi l'Atelier d'Optique qui fournit un travail admirable et sans qui nos cellules microfluidiques n'auraient pas vu le jour.

Je remercie grandement le support technique de Yves Méchulam et Emmanuelle Schmidt du Laboratoire de Biochimie de l'Ecole Polytechnique.

Je remercie tout autant Rachel Méallet et Gilles Clavier du PPSM de l'ENS Cachan, sans qui le ROXS n'aurait pu être mis au point.

Je remercie le personnel de l'enseignement à l'Institut d'Optique avec qui j'ai eu la chance de travailler : Thierry, Lionel, Cédric...

Un grand merci à tous les membres du groupe Optique Atomique, qui ont rendu ces trois ans très agréables : Aurélien, David, Martijn, JB, Thierry, Jeff, Valentina, Alain, Simon, Marie (1 et 2), JP, Rémi, Ben, JC, Pierre, Martin, Thomas VDB, Thomas B, Laurent SP, Isabelle (et tes macarons, qui n'ont pas le goût de cramé), Denis, Vincent (1 et 2), Andrea, Patrick, Carlos, Guthrie, Luca, Guillaume, Chris W... J'espère ne pas en avoir oublié ! Un merci à nos électroniciens André et Fred, dont le talent et la patience ont été très utiles.

Je prends une ligne à part pour Karim, le fier Berbère, que je côtoie depuis les bancs de la fac et avec qui j'ai passé des moments inoubliables, autour d'un banc laser ou d'une cigarette, souvent en compagnie de Jeff, Simon, Juliette et d'autres... Notre duo de comiques, inégalé et inégalable, manquera sûrement (je m'avance un peu là...).

Une spéciale dédicace au grand maître torréfacteur, appelé aussi Grand-Mère, Jacques Vabre ou encore M. Lavazza, dit Sébastien Gleyzes pour le grand public, à la fois ami et voisin, avec qui j'ai pu partager l'amour des bonnes choses (du Sud-Ouest, bien sûr...). Je ne voudrais pas oublier le groupe de discussion des rédacteurs de thèse, que je retrouvais tous les samedis au laboratoire pour partager nos "joies" sur la rédaction, Juliette et JP.

Merci aussi aux "sportifs" de l'Institut, avec qui j'ai pu me défouler : Eric, Simon, Thomas VDB, Andrea, Laurent SP...

Merci à tous ceux que j'ai oubliés (désolé...) de l'Institut d'Optique.

Je veux remercier toute l'équipe du Kasino Arena à Bordeaux avec qui j'ai toujours plaisir à converser autour d'une manzana ou d'un patxaran, jusqu'au bout de la nuit : François, Stéphane, Nicolas, Pipo, Yann, Pierre, Matthieu R, Louis... Je ne leur souhaite que du bonheur et je leur dis à très bientôt... Merci au Maître Jedi qui m'a formé à mes débuts, du côté obscur de la force son enseignement me protège encore...

Un grand merci aux amis tonneinquois, sans qui je serais en train d'écouter de la musique au garde-à-vous : Caroline, Mathieu, Thierry, Simon, Marianne. J'y joins Nicolas et Danika, toujours prêts à partager un moment, même tard le soir.

Je remercie tous les proches qui m'ont aidés à parvenir jusqu'à la thèse ou à la terminer.

Enfin, merci à toute ma famille, parents, soeurs, oncles et tantes, grand-mère, qui m'ont tous soutenu et appris la valeur du travail.

A mes jambes, qui m'ont toujours soutenu...

A mes grands-mères...

Table des matières

1	Introduction	12
1.1	Rôle et activité du ribosome.	12
1.1.1	Généralités sur le ribosome	12
1.1.2	Description rapide du processus de synthèse des protéines.	15
1.1.3	Cycle de traduction de l'ARNm en protéine, présentation détaillée.	15
1.2	L'apport des techniques physiques en molécule unique à la biologie.	19
1.3	Les études du ribosome en molécule unique.	22
1.3.1	Premières expériences <i>in vitro</i> avec un ribosome bactérien actif fixé à une surface.	22
1.3.2	Etudes des changements conformationnels du ribosome lors de la traduction.	24
1.3.3	Etudes de la traduction sur plusieurs cycles d'élongation.	26
1.3.4	Conclusion sur l'état de l'art.	29
1.4	Problématique biologique de notre étude.	30
2	Dispositif de microscopie de fluorescence pour l'observation et l'analyse de molécules uniques.	32
2.1	Choix de la microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRFM). Choix du montage en TIRFM	32
2.1.1	Choix du type de microscopie de fluorescence.	32
2.1.2	Les montages de microscopie TIRF.	34
2.2	Principe de la microscopie TIRF.	36
2.2.1	Description du champ évanescent.	37
2.2.2	Efficacité d'excitation : amplitude et polarisation du champ évanescent.	38
2.2.3	Evolution de la polarisation suivant l'angle d'incidence en configuration TM.	42
2.3	Description du montage optique utilisé dans notre expérience.	44
2.4	Observation de molécules uniques fluorescentes.	46
2.4.1	Optimisation du signal collecté.	46
2.4.2	Origine du fond de fluorescence résiduel.	47
2.5	Analyse des images de fluorescence.	50
2.5.1	Définition du rapport Signal sur Bruit.	50
2.5.2	Extension spatiale des signaux de fluorescence.	52
2.5.3	Photoblanchiment en une étape.	53
2.6	Conclusion.	54
3	Photophysique du Bodipy FL en molécule unique.	55
3.1	Présentation de l'étude biologique et rôle du Bodipy FL dans cette étude.	55
3.2	Propriétés photophysiques du Bodipy FL : état des connaissances.	56

3.3	Photophysique individuelle du Bodipy FL dans un milieu contenant de l'oxygène.	58
3.3.1	Mesure de l'intensité de saturation d'un fluorophore à l'aide du fond de fluorescence de la lamelle couvre-objet.	58
3.3.2	Dispersion de l'intensité de fluorescence du Bodipy FL. Problème de clignotement.	63
3.3.3	Durée de vie du Bodipy FL en présence d'oxygène dans la solution.	67
3.3.4	Prise en compte du photoblanchiment.	67
3.3.5	Conclusion	68
3.4	Photophysique individuelle du Bodipy FL dans un milieu appauvri en oxygène.	68
3.4.1	Effet d'un milieu appauvri en oxygène sur le Bodipy FL.	69
3.4.2	Addition d'anti-oxydants au système enzymatique.	71
3.4.3	Utilisation d'un couple oxydant-réducteur : le système ROXS.	71
3.4.4	Mesure de la durée de vie et d'intensité de saturation du Bodipy FL avec le système ROXS	76
3.4.5	Mesure de l'intensité de saturation du Bodipy FL avec le système ROXS	77
3.4.6	Comparaison des intensités de saturation du Bodipy FL avec et sans ROXS.	79
3.5	Conclusion.	82
4	Fonctionnalisation de surface et cellule microfluidique.	84
4.1	Nettoyage des lamelles de microscope.	85
4.2	Fonctionnalisation type BSA.	85
4.3	Fonctionnalisation type PEG.	86
4.3.1	Chimie de surface préalable.	86
4.3.2	Fixation du PEG à la surface.	87
4.4	Exemples d'études comparatives en molécules uniques fluorescentes sur surfaces BSA et PEG	88
4.4.1	Interactions avec une surface BSA.	88
4.4.2	Interaction avec une surface PEG/PEG-biotine.	89
4.4.3	Préparation des ribosomes marqués QD en vue d'une accroche sur une surface PEG.	90
4.4.4	Validation de la surface PEG avec des ribosomes marqués par QD.	91
4.5	Conception d'une cellule microfluidique adaptée à notre étude.	94
4.5.1	Considérations préalables à la fabrication.	94
4.5.2	Description de la cellule microfluidique.	95
4.6	Evaluation de la spécificité des interactions dans la cellule microfluidique.	96
4.6.1	Tests avec des oligonucléotides marqués Cy5.	96
4.6.2	Tests avec des ribosomes marqués QD.	97
4.7	Conclusion.	97
5	Observation de l'activité de ribosomes uniques par microscopie de fluorescence.	99
5.1	Observation en molécule unique de l'incorporation de lysine-Bodipy FL pendant la traduction d'un ARNm poly-A.	100
5.2	Elaboration d'un ribosome ayant une mutation spécifique pour l'accroche d'un QD.	101
5.2.1	Etat de l'art des modifications déjà réalisées sur des ribosomes pour y effectuer une accroche spécifique.	101

5.2.2	Notre méthode pour muter un ribosome E. Coli par fusion de protéine et purification des ribosomes mutés.	105
5.2.3	Tests d'accroche entre les ribosomes-GST et les QD anti-GST.	106
5.2.4	Tests d'activité comparés des ribosomes mutés en mesure d'ensemble, avec et sans QD.	108
5.3	Elaboration des différents ARNm.	109
5.3.1	Synthèse de l'ARNm poly-A.	111
5.3.2	Biotinylation de l'ARNm.	111
5.3.3	Synthèse de l'ARNm GFP avec une extension en 3'.	111
5.4	Expériences en molécule unique avec les ribosomes marqués QD.	112
5.4.1	Synthèse d'une protéine GFP par un ribosome-QD.	112
5.4.2	Expérience en cours sur l'incorporation de lysine-Bodipy FL par un ribosome accroché spécifiquement à la surface.	119
5.4.3	Observation simultanée (colocalisation) du ribosome marqué QD ou ATTO et des lysines-Bodipy FL incorporées.	123
5.5	Conclusion	124
6	Développement d'une pince optique.	126
6.1	Rappels théoriques sur le piégeage par faisceau laser.	126
6.1.1	Régime de Rayleigh.	127
6.1.2	Régime de Mie.	127
6.1.3	Bilan.	129
6.2	Montage du banc laser de piège de la pince optique.	130
6.3	Description d'une expérience de pince optique en biologie.	131
6.4	Détection de la position de la bille.	132
6.4.1	Dispositif expérimental.	132
6.4.2	Résolution spatiale.	132
6.5	Description du mouvement de la bille dans le piège	133
6.6	Détermination de la force appliquée.	135
6.6.1	Caractérisation du déplacement de la bille dans le piège.	136
6.6.2	Caractérisation de la raideur du piège.	137
6.7	Expérience de biophysique.	138
6.8	Conclusion.	139

Introduction générale.

Le ribosome est la machine moléculaire responsable de la synthèse des protéines dans tous les organismes vivants. Pour cela, il lit le code génétique porté par l'ARN messager (ARNm) et le traduit en protéine en associant les acides aminés correspondant à ce code génétique. Le ribosome intervient donc dans l'organisme à une étape clé : la synthèse de toutes les protéines nécessaires à la survie de la cellule. De l'activité des protéines dépendent de nombreuses fonctions vitales, ce processus doit donc être extrêmement robuste, c'est-à-dire avec un très faible taux d'erreur. Or, le processus de traduction de l'ARNm en protéine est très complexe. De nombreux changements de conformation du ribosome s'effectuent lors de la synthèse, pour synthétiser la protéine et pour se déplacer sur l'ARNm.

Cette synthèse fait intervenir l'ARN et les protéines ribosomales, mais aussi différents facteurs protéiques et nucléiques extérieurs. Plusieurs étapes importantes ont été étudiées en structure par diffraction de rayons X, RMN ou cryo-microscopie électronique, et ont permis de comprendre le rôle de ces facteurs externes, et d'analyser les changements de conformations du ribosome. Mais ces études structurales sont très difficiles à réaliser, et ne permettent pas d'observer la dynamique de la traduction. Pour exemple, il a fallu cinquante ans d'efforts entre la découverte du ribosome [1] et la structure complète d'un ribosome procaryote par diffraction de rayons X [2]. De même, les expériences de traduction en mesure d'ensemble à l'aide de méthodes de biochimie ne peuvent répondre à certaines questions, car les événements rares ne sont pas toujours discernables.

Les techniques dites en molécule unique peuvent apporter une information nouvelle. Celles-ci permettent l'observation de l'activité de systèmes biologiques moléculaires un par un, et ainsi la collection d'informations non accessibles par des mesures d'ensemble. De plus, on peut aussi observer la dynamique de ces systèmes, en regardant leur évolution au cours du temps. Elles ont été appliquées avec succès sur un grand nombre de moteurs moléculaires depuis une quinzaine d'années, et plus récemment aux études portant sur le ribosome, que ce soit en microscopie de fluorescence ou en spectroscopie de force, à l'échelle de la molécule unique.

Mon travail de thèse s'est déroulé en collaboration entre deux équipes : celle de D. Fourmy et S. Yoshizawa de l'ICSN, spécialistes du ribosome et de la traduction, et l'équipe biophotonique du groupe d'Optique Atomique du LCFIO, qui s'attache à mettre au point des dispositifs optiques pour étudier des systèmes biologiques à l'échelle de la molécule unique.

Notre collaboration vise particulièrement l'observation en molécule unique des interactions entre le ribosome et l'ARN messager lors de la traduction. Pour ce faire, nous souhaitons observer, en microscopie de fluorescence, l'incorporation d'acides aminés lysines, marqués avec un fluorophore organique, dans la protéine en formation. Ce fluorophore est le Bodipy FL. On pourra compter le nombre d'acides aminés incorporés au cours du temps en dénombrant les Bodipy FL. De plus, nous souhaitons marquer

spécifiquement le ribosome, pour colocaliser les ribosomes avec les protéines marquées Bodipy FL.

Le travail présenté ici relate le développement des étapes nécessaires pour l'aboutissement d'un tel projet, car il a commencé peu après la création de l'équipe de biophysique au sein du groupe Optique Atomique. Pendant ces trois dernières années, il a fallu développer un laboratoire de biophysique à même de travailler dans des conditions optimales pour observer la synthèse d'une protéine par le ribosome en microscopie de fluorescence de molécule unique. Ce travail sera présenté en six chapitres.

Le premier chapitre sera consacré à la présentation du système biologique étudié dans cette thèse, le ribosome procaryote d'*E. coli*. Nous y décrirons la structure du ribosome et son activité traductionnelle. Nous présenterons ensuite un état de l'art des expériences en molécule unique sur le ribosome. Ces différentes études apporteront un éclairage sur les étapes franchies dans l'observation en molécule unique de l'activité du ribosome.

Dans le second chapitre, nous présenterons la technique de microscopie de fluorescence par ondes évanescentes (TIRFM) utilisée dans nos expériences. Nous montrerons l'intérêt de cette technique pour les études du ribosome en microscopie de fluorescence. Nous y détaillerons quelques calculs sur l'influence de la polarisation du faisceau incident, et sur la meilleure configuration pour nos expériences. Nous y décrirons notre méthode d'analyse de fluorophores uniques, afin de déterminer de manière précise le rapport signal sur bruit pour chaque molécule observée.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons l'étude du Bodipy FL, fluorophore marquant les acides aminés incorporés lors des expériences de traduction. En effet, les propriétés photophysiques de ce fluorophore sont peu connues en molécule unique, et nous avons besoin de les déterminer pour pouvoir compter précisément le nombre d'acides aminés incorporés par le ribosome. Nous décrirons l'intensité de fluorescence du Bodipy FL pour une intensité d'excitation donnée ainsi que sa durée de vie, dans un tampon contenant de l'oxygène. Nous montrerons aussi une étude dans le but d'améliorer la durée de vie du Bodipy FL, par l'association d'un oxydant et d'un réducteur dans un milieu appauvri en oxygène. On exposera les nouveaux résultats concernant les propriétés photophysiques du Bodipy FL dans ces conditions.

Dans le chapitre quatre, nous décrirons l'élaboration de la fonctionnalisation de la lamelle de microscope. En effet, dans les expériences en TIRFM, il est nécessaire de fixer le système biologique à la surface de la lamelle de microscope. Nous montrerons que l'accroche de systèmes biologiques marqués sur une surface peut être problématique pour des expériences de microscopie de fluorescence en molécule unique. Nous décrirons les diverses étapes ayant permis d'obtenir des surfaces ayant la qualité nécessaire pour la réalisation de nos études. A la fin de ce chapitre, nous décrirons la cellule microfluidique développée pour nos expériences. Nous analyserons la qualité des surfaces réalisées en cellule microfluidique.

Dans le chapitre cinq, nous présenterons les expériences portant sur le ribosome. Nous décrirons l'élaboration d'un ribosome modifié, permettant l'accroche spécifique d'un marqueur fluorescent. Nous avons choisi d'utiliser un nanocristal semiconducteur photoluminescent (QD), car celui-ci ne photoblanchit au cours du temps, pour observer le ribosome pendant toute la traduction. L'activité d'un ribosome avec un tel marqueur n'étant pas évidente, nous décrirons les expériences réalisées en mesures d'ensemble

pour prouver son activité. Nous décrirons ensuite les expériences préliminaires sur l'incorporation d'acides aminés fluorescents, avec des ribosomes marqués QD ou non. Dans la partie suivante, nous détaillerons les expériences préliminaires en molécule unique réalisées avec des ribosomes marqués QD, cela sans acide aminé marqué. Cette partie se conclura sur les perspectives à court terme sur ces expériences en molécule unique.

Enfin, dans le chapitre six, nous présenterons un travail préliminaire sur le développement d'une pince optique, dans le but de mesurer les forces de cohésion de structures particulières de l'ARN messager. Cette partie sera consacrée au développement d'un banc laser pour le piégeage de billes diélectriques micrométriques. Nous y décrirons le montage de détection et de mesure de forces, et les techniques de calibration d'une pince optique.

Chapitre 1

Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons un bref rappel historique sur la découverte du ribosome, le système que nous étudions, et sur les différentes avancées des études structurales. Celles-ci, même si elles n'ont pas un rapprochement direct avec nos expériences, ont permis de cibler les modifications à apporter au ribosome pour permettre l'étude en molécule unique. Nous présenterons ensuite l'activité biologique du ribosome, la synthèse des protéines à partir de l'ARNm (traduction). Nous décrirons les différentes étapes de cette synthèse. Nous présenterons ensuite un état de l'art des expériences en molécule unique portant sur ces étapes de synthèse, des changements conformationnels du ribosome à l'observation de la synthèse d'une protéine. Enfin, nous décrirons les enjeux biologiques approchés par notre équipe lors de cette thèse.

1.1 Rôle et activité du ribosome.

1.1.1 Généralités sur le ribosome

Rôle et découverte.

Le ribosome est présent dans les trois domaines du vivant : les bactéries, les archées et les cellules eucaryotes. Les deux premiers types appartiennent au groupe procaryote, c'est-à-dire celui de cellules sans noyaux. Dans ces systèmes, les ribosomes, bien que de structures différentes, ont une activité similaire. Cela démontre la robustesse des processus liés aux ribosomes au cours de l'évolution. Le ribosome a pour rôle de synthétiser toutes les protéines de l'organisme, à partir du code génétique. On estime la vitesse de synthèse des protéines entre 6 et 20 acides aminés par seconde, avec un taux d'erreur de 1 pour 10000. Le ribosome lit le code génétique porté par l'ARN messager (ARNm) et associe les acides aminés correspondants. Le ribosome mesure environ 20 nm de diamètre et a une masse molaire d'environ 2,5 MDa¹. C'est donc une macromolécule, extrêmement complexe, qui fabrique les protéines.

Le ribosome est composé de deux sous-unités, nommées par leurs coefficients de sédimentation lors d'une centrifugation (unité Svedberg, S). Pour les eucaryotes, les deux sous-unités sont dénommées 40S (petite sous-unité) et 60S (grande sous-unité), ce qui donne, une fois réunies, le ribosome 80S. Pour les ribosomes procaryotes, la petite sous-unité et la grande sous-unité sont dénommées respectivement 30S et 50S, et le ribosome complet 70S. On ne parlera désormais que des ribosomes procaryotes, objets d'étude de cette thèse.

Le ribosome a été découvert par le biologiste George Palade en 1955, qui l'a observé par

¹Dalton (Da) : unité de masse molaire, 1 Da correspondant à la masse molaire d'un atome d'hydrogène, 1 g/mol.

microscopie électronique [1]. Une des images de plusieurs types de cellules en microscopie électronique, prise par G. Palade est reproduite sur la Figure 1.1.

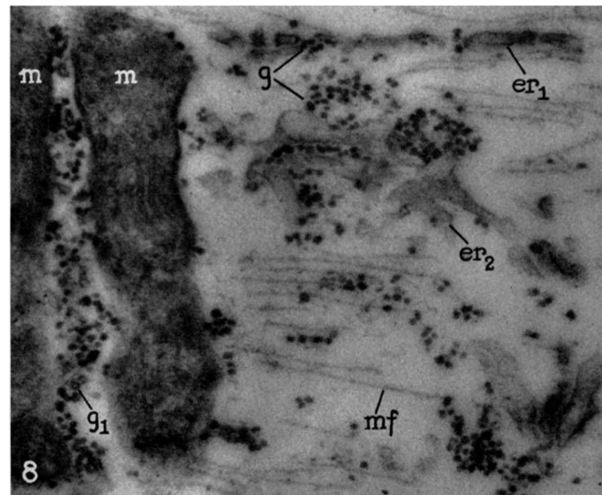


FIG. 1.1 – Image en microscopie électronique (grandissement $\times 85000$) réalisée dans [1]. L'échantillon est une cellule musculaire de diaphragme de rat. Les points noirs, dénommés *g* dans l'image, sont les ribosomes. Les auteurs lui attribuent une taille d'environ 20 nm.

Les techniques d'observation ayant bien évolué depuis la découverte du ribosome, la structure atomique du ribosome procaryote a même été décrite récemment par diffraction de rayons X [3, 4, 5] (Figure 1.2).

Description du ribosome procaryote.

Le ribosome 70S bactérien est le lien entre l'information génétique contenue dans l'ADN et son expression protéique. C'est un complexe ribonucléoprotéique d'à peu près 2,3 MDa. Il est constitué d'une grande sous-unité 50S et d'une petite sous-unité 30S (1,5 et 0,8 MDa respectivement), chacune formée de deux tiers d'ARN (ARNr) et d'un tiers de protéines.

La sous-unité 50S contient deux molécules d'ARNr : 23S (2900 nucléotides (nt)) et 5S (120 nt) ainsi que 34 protéines (notées L-protéines) tandis que la petite sous-unité contient un seul ARN 16S (1500 nt) et 21 protéines (S-protéines).

La morphologie globale du ribosome bactérien a d'abord été déterminée par microscopie électronique vers le milieu des années soixante-dix. Les premiers cristaux de la sous-unité 50S de *B.stearotherophilus* ont été obtenus dans les années 80, vingt ans d'efforts ont été nécessaires pour obtenir des structures tridimensionnelles à haute résolution pour arriver à la structure du ribosome 70S de *T.thermophilus* avec une résolution atomique, en complexe avec les ARNt et l'ARNm. Ces résultats ont été très difficiles à obtenir car l'obtention de cristaux de grande taille et de bonne qualité est difficile. En effet, de la qualité de ces cristaux dépend la résolution de la structure. L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence certains rôles structuraux et fonctionnels assurés par les constitutants du ribosome.

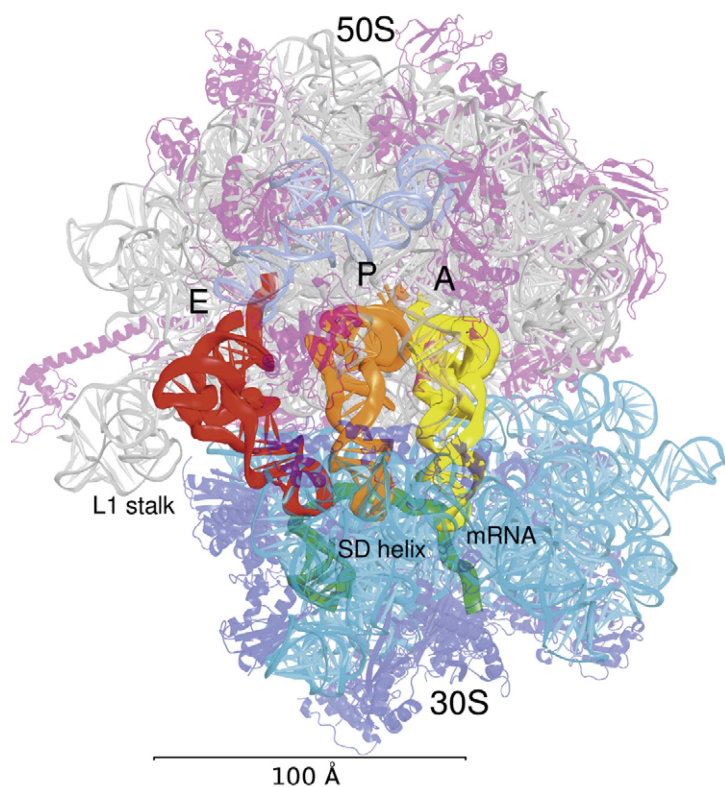


FIG. 1.2 – Image reconstruite à partir de la figure de diffraction sur un cristal de ribosome 70S avec une source de rayons X (résolution de l'image : 2,8 Å). La grande sous-unité est située dessus en gris, l'image de la petite sous-unité est située en dessous, en bleu. Les sites A, P et E (expliqués plus loin) avec les ARNt sont respectivement représentés en or, orange et rouge. Les protéines ribosomales sont représentées aussi en mauve sur la 50S et en bleu foncé sur la 30S. Image extraite de [6].

1.1.2 Description rapide du processus de synthèse des protéines.

L'ARNm porte le code génétique nécessaire à la synthèse des protéines. L'ARNm est composé de nucléotides² et peut être décomposé en codons. Un codon, formé de trois nucléotides, code pour un acide aminé. Pour associer les acides aminés correspondant à l'ARNm, il est nécessaire d'avoir une molécule pour reconnaître ces codons. Cette molécule est l'ARN de transfert (ARNt). On notera l'ARNt avec son acide aminé aa-ARNt^{aa}, on parlera alors d'ARNt "chargé". Sans acide aminé, on dira que l'ARNt est déacylé. L'ARNt comporte aussi 3 nucléotides composant un anti-codon, complémentaire d'un codon spécifique de l'ARNm. Il est nécessaire d'avoir maintenant un système capable de lier les acides aminés entre eux pour fabriquer la protéine conforme à l'ARNm. C'est le ribosome qui catalyse la synthèse des protéines. Cette synthèse, appelée traduction, est décomposée en 4 étapes.

- Les deux sous-unités du ribosome vont se complexer sur l'ARNm au niveau du codon initiateur, départ de la séquence codante pour une protéine (initiation).
- Le ribosome se déplace de codon en codon (translocation), en associant à chaque fois l'acide aminé correspondant (élongation) au codon de l'ARNm, reconnu par l'anti-codon de l'ARNt portant l'acide aminé.
- A la fin de la synthèse de la protéine, déterminée par le codon stop sur l'ARNm, le ribosome termine la protéine, puis la relargue (terminaison).
- Une fois cette étape accomplie, le ribosome se détache de l'ARNm et les deux sous-unités sont dissociées. Elles seront à nouveau associées pour la synthèse d'une autre protéine (recyclage).

De nombreux facteurs interviennent durant ces différentes étapes, pour complexer les deux sous-unités sur ribosomes, pour apporter les ARNt chargés au ribosome (EF-Tu), pour amener l'énergie nécessaire au ribosome, sous forme de GTP, pour se déplacer et effectuer les différents changements conformationnels (EF-G) et enfin les différents facteurs de terminaison et de recyclage.

Une description plus détaillée du processus de traduction est présentée dans la partie suivante.

1.1.3 Cycle de traduction de l'ARNm en protéine, présentation détaillée.

Nous allons présenter la traduction en détaillant chacune des étapes.

Description des différents acteurs de la traduction.

Pour mieux expliciter les étapes de la traduction, nous allons commencer par établir un lexique des termes utilisés (notations dans les Figures 1.3 et 1.4).

Deux types de molécules d'ARN sont impliquées dans la traduction :

- l'ARNm, qui porte l'information génétique codant pour la protéine. Il se lit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.
- l'ARNt, qui reconnaît le codon de l'ARNm par appariement Watson-Crick³, et qui porte l'acide aminé correspondant à ce codon. L'ARNt est dit "chargé" dans ce cas. On l'écrit aa-ARNt^{aa}. Il est déacylé sans acide aminé. On l'écrit ARNt^{aa}.

Il y a deux codons importants :

- le codon initiateur sur l'ARNm, AUG, codant pour un fMet-ARNt^{fMet}, qui est l'ARNt initiateur. Celui-ci est positionné sur le site P du ribosome lors de l'initiation.

²Ils sont au nombre de 4 : adénine, guanine, cytosine, uracile (A, G, C, U respectivement).

³Un appariement Watson-Crick est formé de plusieurs liaisons hydrogènes, qui permettent aux nucléotides de l'ADN (ou pour l'ARN dans ce cas) de s'apparier avec A-T (U pour l'ARN) et C-G.

- les codons stop, terminant la traduction de l'ARNm, qui sont UAA, UAG ou UGA. Il n'existe pas d'ARNt chargé pour ces codons. Ces codons sont reconnus par des facteurs de terminaison.

Les principaux sites du ribosome impliqués dans la traduction sont :

- le site de liaison de l'aminoacyl-ARNt (site A), qui correspond au site d'accueil de l'ARNt chargé.
- le site de liaison du peptidyl-ARNt (site P), qui correspond au site d'accueil du polypeptide, toujours lié à l'ARNt issu de la dernière incorporation.
- le site E, qui est le site d'évacuation de l'ARNt libéré de son acide aminé.
- le centre peptidyl-transférase, qui est le site où la liaison peptidique est effectuée.

Ces sites sont complets lors de la formation du complexe 70S sur l'ARNm, à l'interface des sous-unités 30S et 50S.

Les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison sont :

- Les 3 facteurs d'initiation IF1, IF2, IF3 (IF : initiation factor).
- Les deux facteurs d'élongation EF-Tu (Tu pour "temperature unstable") et EF-G (G pour GTPase). EF signifie "elongation factor".
- Les trois facteurs de terminaison RF1, RF2 et RF3 (RF pour "release factor").
- Le facteur RRF (ribosomal release factor) qui dissocie la 30S de la 50S.

Nous allons décrire les étapes d'initiation, d'élongation, de terminaison et de recyclage.

L'initiation.

Lors de l'étape d'initiation, les deux sous-unités 30S et 50S s'associent sur l'ARNm, pour former le ribosome complet 70S. Ce complexe se forme sur la séquence de l'ARNm dite Shine-Dalgarno⁴ avec l'ARNt initiateur chargé (fMet-ARNt^{fMet}) dans le site P, correspondant au codon initiateur AUG de l'ARNm. Trois facteurs d'initiation (IF1, IF2 et IF3) augmentent la stabilité du complexe tout en catalysant sa formation [3]. Les deux sous-unités du ribosome sont au départ séparées. IF3 se lie à la sous-unité 30S avec le codon initiateur au site P puis IF1 et IF2 "accompagnent" le fMet-ARNt^{fMet} vers ce même site P. La sous-unité 50S s'associe ensuite au complexe, les facteurs d'initiation sont relargués tandis que l'ARNt initiateur se prépare pour la liaison peptidique avec l'acide aminé suivant, arrivé dans le site A. Le ribosome est alors prêt à effectuer les cycles d'élongation.

L'élongation.

Le cycle d'élongation du ribosome procaryote est représenté sur la Figure 1.3. Chaque cycle d'élongation correspond à la lecture d'un codon sur l'ARNm et l'ajout de l'acide aminé correspondant à la chaîne polypeptidique en formation. Le facteur d'élongation EF-Tu, en complexe avec le GTP, apporte un ARNt chargé (aa-ARNt^{aa}) au site A du ribosome, où se trouve le codon en cours de lecture.

La fidélité de la traduction repose sur la sélection du bon aa-ARNt^{aa} en réponse au codon dans le site A. L'aa-ARNt^{aa} est apportée au site A par EF-Tu. Si l'appariement Watson-Crick codon-anticodon est correct, l'hydrolyse du GTP en GDP va permettre à EF-Tu de relarguer l'aa-ARNt^{aa} dans le site A. Le taux d'erreur global d'incorporation des résidus dans la chaîne polypeptidique est de $\approx 10^{-4}$. Une fois libéré, EF-Tu sera à nouveau chargé avec du GTP grâce au facteur d'échange EF-Ts.

Au centre peptidyl-transférase, l'ARNr 23S catalyse le transfert complet de la chaîne polypeptidique en formation sur l'aa-ARNt^{aa} au site A. L'ARNt initialement présent

⁴C'est une séquence de l'ARNm comportant 6 nucléotides (5'- AGGAGG -3'), située entre 6 et 12 nucléotides en amont du codon initiateur AUG, qui permet à la petite sous-unité de se positionner correctement pour commencer la traduction.

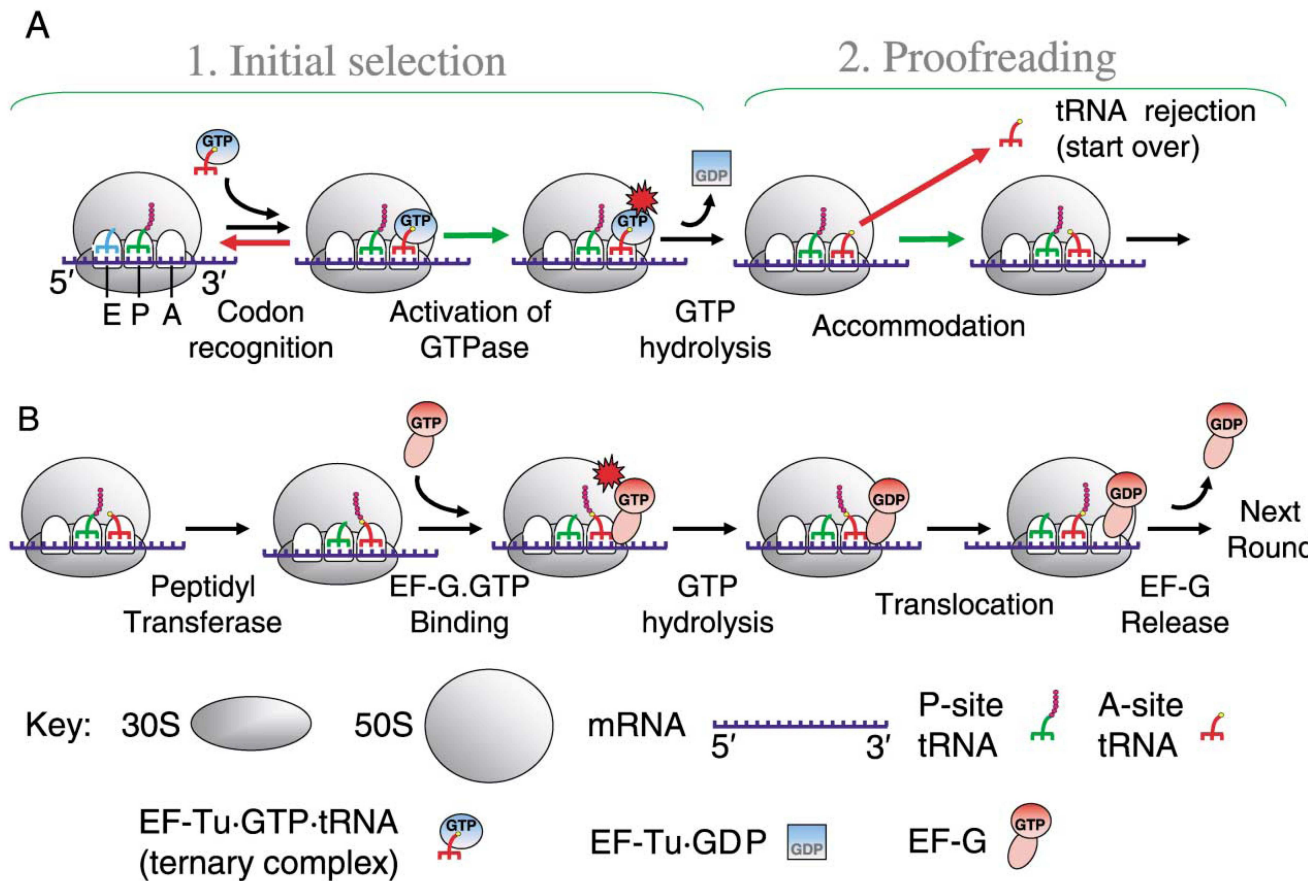


FIG. 1.3 – Schéma du cycle d'élongation de la traduction. Sur le premier dessin (en haut à gauche) le ribosome a déjà associé plusieurs acides aminés, on a un peptide (moins de 50 acides aminés) ou un polypeptide (plus de cinquante acides aminés). Lorsque celui-ci sera terminé, on aura une protéine. Ce polypeptide est situé dans le site P lié à un ARNt. Le site A correspond au site d'accueil de l'ARNt chargé avec son acide aminé. Le site E correspond au site d'évacuation de l'ARNt non chargé (sans acide aminé). Différents facteurs agissent lors de la traduction, comme explicité dans le texte. Image issue de [3].

au site P est déacylé. La protéine EF-G catalyse alors la translocation des deux ARNt présents aux sites P et A vers les sites E (exit) et P respectivement. En même temps, la protéine EF-G fait avancer le ribosome d'un codon sur l'ARNm par l'hydrolyse d'une molécule de GTP. L'ARNt déacylé au site E est "éjecté" du ribosome. Quand EF-G se dissocie du ribosome, le site A est vide, prêt à accepter un nouveau aaARNt. Un nouveau cycle d'élongation démarre.

La terminaison.

La terminaison se produit lorsque le ribosome atteint un codon stop. Ce dernier est reconnu par deux facteurs de terminaison : RF1 ou RF2. La fixation de l'un de ces facteurs au site A provoque l'hydrolyse et le relargage de la protéine portée par l'ARNt au site P. Le facteur RF3 catalyse quant à lui la dissociation de ces facteurs du ribosome.

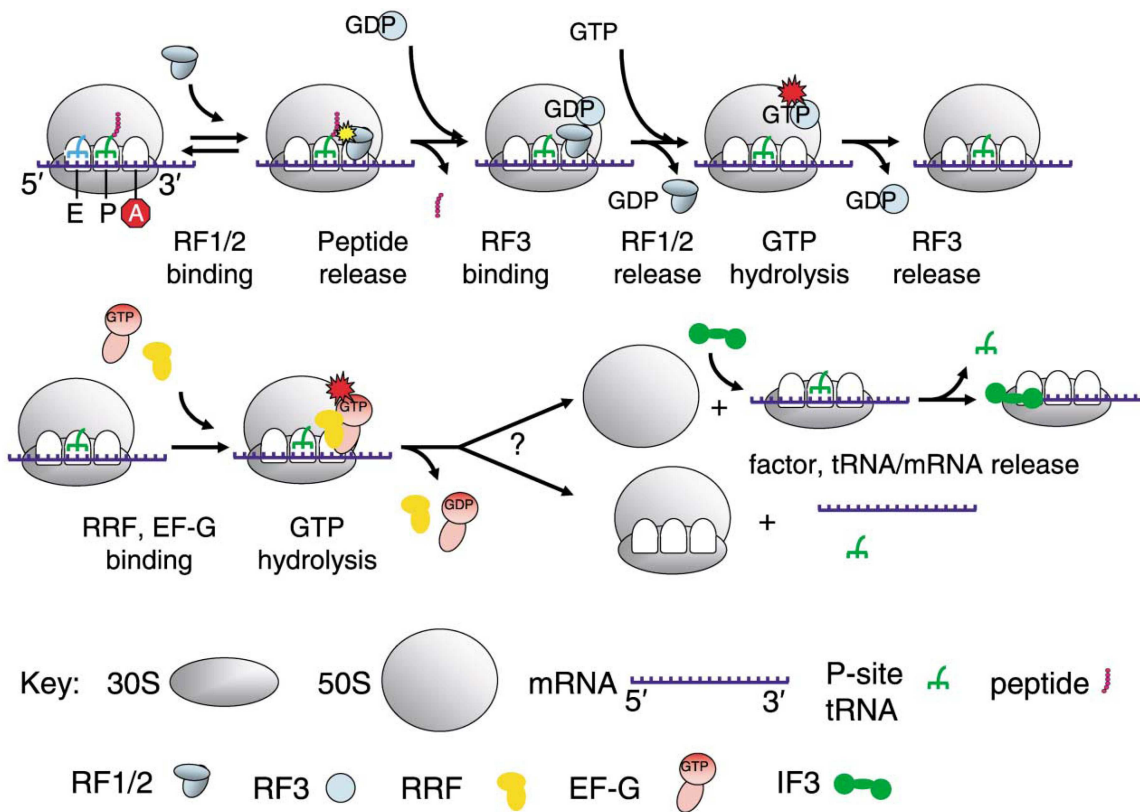


FIG. 1.4 – Schéma du cycle de terminaison de la traduction. Le codon stop sur l'ARNm au site A (hexagone rouge) est reconnu par les facteurs RF1 ou RF2 dans le but d'hydrolyser la liaison ester qui relie le polypeptide à l'ARNt dans le site P et de relarguer le peptide de l'ARNt situé dans le site P. Le facteur RF3-GDP intervient alors pour induire le relargage de RF1/2. L'échange du GDP avec du GTP provoque le relargage de RF3. Le ribosome est alors fixé sur l'ARNm avec un ARNt déacylé au site P. Le complexe est dissocié par le facteur RRF et le facteur EF-G. La dissociation de la sous-unité 50S par l'hydrolyse du GTP du facteur d'initiation IF3 est nécessaire pour dissocier l'ARNt déacylé du site P. Figure issue de [3].

Le recyclage (ou post-terminaison).

Cette étape conduit à la dissociation du complexe 50S-30S-ARNt-ARNm en chacun des composants. Elle fait intervenir le Ribosome-Recycling Factor (RRF) ainsi que EF-G.

Deux modèles décrivent actuellement cette étape. Dans le premier, RRF et EF-G agiraient simultanément pour dissocier les deux sous-unités, ARNm et ARNt restant associés à la sous-unité 30S. C'est alors IF3 qui catalyserait la dissociation du complexe 70S-ARNm-ARNt. Dans le deuxième modèle, RRF se fixerait au site A du ribosome puis EF-G catalyserait sa translocation de RRF vers le site P, ainsi que l'ARNt déacylé vers le site E d'où il sera relargué. Ceci conduirait à la formation d'un complexe RRF/EF-G sur le ribosome dont l'hydrolyse d'une molécule de GTP de l'EF-G entraînerait le relargage ainsi que la libération de l'ARNm, les deux sous-unités restant associées. De récents travaux en structure du ribosome bactérien 70S n'ont pas encore tranché ce débat [7, 8].

1.2 L'apport des techniques physiques en molécule unique à la biologie.

Les techniques dites "classiques" utilisées en biologie pour les études en structure ou en dynamique ont permis de grandement accroître les connaissances en biologie. Citons par exemple la découverte de la structure de l'ADN grâce à la diffraction de rayons X par des cristaux d'ADN [9]. Mais, comme le disait R. P. Feynman [10], "il est très facile de répondre à beaucoup de ces questions fondamentales en biologie ; il suffit d'observer la chose!". Or, le problème ici est de parvenir à observer ce monde à l'échelle nanométrique sans le perturber. C'est là que les techniques à l'échelle de la molécule unique interviennent. En effet, leur caractère novateur est de permettre l'observation de phénomènes dynamiques, comme des déplacements ou des changements conformationnels, cela à l'échelle moléculaire, pendant l'activité de ces systèmes biologiques. Cela donne accès à des événements rares, qui sont noyés dans la moyenne lors de mesures d'ensemble, qui ont une grande importance au final dans l'activité biologique. Cela donne aussi accès à des états transitoires qu'on ne pourrait pas observer en figeant le système (état hors d'équilibre) ou difficile à observer car on ne peut aisément synchroniser les systèmes biologiques pour une mesure d'ensemble. De plus, on a accès à la dynamique de ces événements. Nous allons décrire ici deux techniques en molécule unique : le smFRET (single molecule Förster Resonant Energy Transfert), une technique d'observation à la résolution nanométrique, et la pince optique, une technique permettant l'application ou la mesure de forces à l'échelle moléculaire (pN). Ces deux techniques méritent plus d'attention car elles sont utilisées dans l'étude de la traduction.

La technique smFRET.

Cette méthode dérivée de la microscopie de fluorescence, mise au point au milieu des années 90 dans le groupe de Shimon Weiss (UCLA) [11], permet de voir des déplacements variant de 1 à 10 nm entre deux molécules fluorescentes. Une des molécules fluorescentes a un spectre d'émission qui recouvre le spectre d'absorption de l'autre molécule fluorescente (voir Figure 1.5, bas). Il y aura un transfert résonnant d'énergie entre ces deux molécules proportionnel à la distance qui les sépare (voir Figure 1.5, haut). Ce transfert d'énergie a une efficacité égale à $k_{FRET} = (1 + (R/R_0)^6)^{-1}$, avec R la distance entre les molécules fluorescentes, R_0 le rayon de Förster pour lequel l'efficacité de transfert est égale à 0,5. Le rayon de Förster est de l'ordre de 5 nm environ. Cette technique, par mesure du taux de transfert, permet de mesurer des variations de distance entre les molécules de 1 à 10 nm. Donc, en fixant le donneur et l'accepteur sur l'espèce biologique étudiée à des endroits choisis, on peut observer ses changements de conformation.

Cette technique permet de voir des changements conformationnels dans des systèmes à l'échelle de la molécule unique, car les modifications structurales font intervenir des dépla-

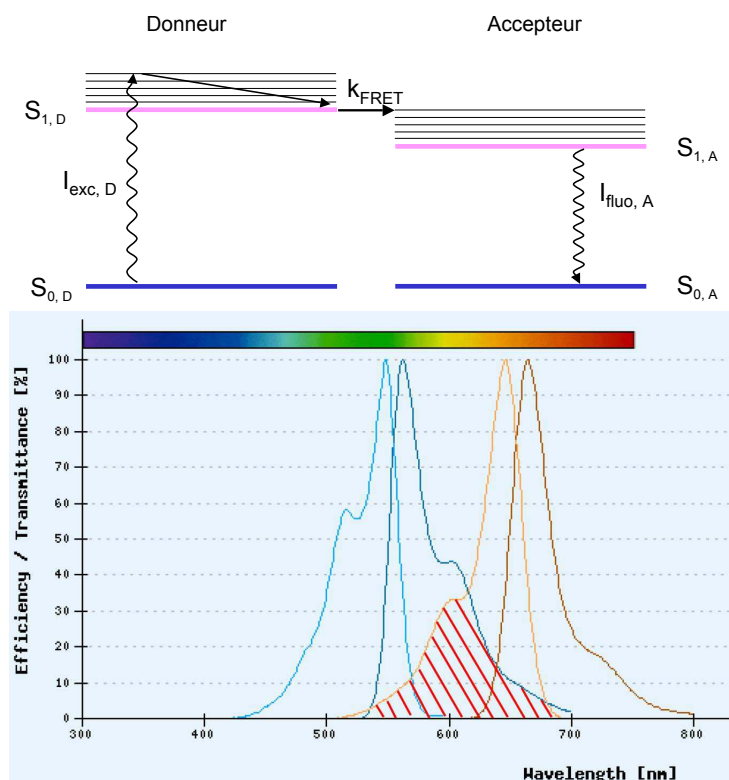


FIG. 1.5 – Schéma de principe du FRET en haut. On a représenté les niveaux d'énergie de la molécule fluorescente dite "donneuse" et ceux de la molécule fluorescente dite "acceptrice". k_{FRET} est le taux de transition du donneur vers l'accepteur. Un couple donneur/accepteur bien connu est Cy3/Cy5. Les spectres de ces deux fluorophores sont représentés en bas, avec les spectres s'absorption (bleu clair et orange respectivement) et d'émission (bleu foncé et marron respectivement). En hachuré, la bande spectrale où le spectre d'émission du donneur recouvre celui d'excitation de l'accepteur. Image issue de Zeiss.

1.2. L'APPORT DES TECHNIQUES PHYSIQUES EN MOLÉCULE UNIQUE À LA BIOLOGIE

cements de 5 nm typiquement. L'échelle des changements conformationnels du ribosome en fait un bon candidat pour les études en smFRET.

La pince optique.

Cette technique permet de mesurer des forces sur des systèmes biologiques à l'échelle moléculaire. Elle est particulièrement utile dans l'étude des moteurs moléculaires (kinésine, myosine, polymérase...) ou des forces de cohésion dans les systèmes moléculaires (ADN, ARN...). Les forces caractéristiques pouvant être appliquées par une pince optique se situent entre 0,1 pN et 100 pN. C'est l'ordre de grandeur des forces en jeu dans les systèmes biologiques moléculaires. La première application sur un moteur moléculaire a été développée dans le groupe de S. Block (Stanford) [12] dans le milieu des années 90. Le ribosome, de part sa capacité à se mouvoir sur l'ARNm, est à ranger dans la catégorie des moteurs moléculaires. L'application de la pince optique peut donc permettre d'étudier les interactions ribosome/ARNm.

Un faisceau laser fortement focalisé peut piéger une particule diélectrique, comme une bille de silice ou de polystyrène micrométrique. En accrochant cette bille au système biologique étudié pour y appliquer une force, on peut mesurer les forces de cohésions en jeu dans ce système. Pour cela il est nécessaire d'avoir un point d'accroche fixe sur la molécule, pour appliquer une force quantifiable. On peut se servir d'une autre molécule fixe, de la lamelle de microscope ou encore d'une autre bille piégée. Différentes configurations permettent de réaliser ces expériences (voir Figure 6.5). Une pince optique est modélisable par un piège harmonique, donc on peut écrire la force (à 1 dimension) : $\mathbf{F} = -k \cdot \mathbf{x}$, k étant la raideur du piège et $\mathbf{x}$ le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre dans le piège.

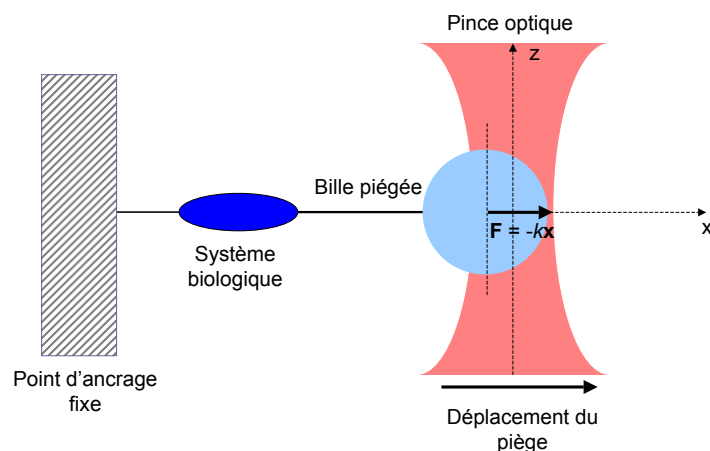


FIG. 1.6 – Schéma de principe d'une pince optique. Une bille diélectrique micrométrique (en bleu ciel) est piégée par un faisceau laser fortement focalisé (en rouge). Cette bille est reliée au système biologique sur lequel on souhaite appliquer une force. Ce système biologique est lui-même attaché à un point d'ancrage fixe (qui peut être une autre bille, la surface de la lamelle de microscope...). Pour qu'une force soit appliquée, le piège est déplacé, et donc la bille aussi, car elle est retenue par le système biologique. Ce déplacement de la bille dans le piège crée une force de rappel $\mathbf{F}$.

Cette technique a été appliquée avec succès au ribosome, une de ces expériences sera présentée dans la partie suivante, consacrée à l'état de l'art des expériences en molécule unique sur le ribosome.

Pour le smFRET ou la pince optique, on peut se reporter au livre de P. Selvin et T. Ha : "Single Molecule Techniques, A laboratory Manual" [13]. Ils y décrivent en plus

d'autres techniques d'observation en molécule unique pour la biologie.

1.3 Les études du ribosome en molécule unique.

Les études structurales du ribosome bactérien en complexe avec divers éléments (ARNt, ARNm, facteurs...) ont permis de bien comprendre plusieurs étapes de la traduction. Plusieurs revues sur les études en structure [3, 4, 5] reportent les grandes avancées réalisées en microscopie électronique, en cryo-microscopie électronique, en RMN ou encore en diffraction de rayons X sur des cristaux de ribosomes. Ces résultats ne permettent malheureusement pas d'accéder à l'observation de la dynamique du ribosome, ce qui est maintenant possible en molécule unique. On peut ainsi observer des ribosomes en activité et quantifier la dynamique de certaines étapes, et cela lors d'observations directes *in vitro*. Dans ce paragraphe, nous présenterons différentes expériences. Nous commencerons par les premières observations de ribosomes actifs *in vitro*, adsorbés non spécifiquement sur une surface [14, 15, 16]. Ces expériences historiques ont permis de valider l'approche consistant à étudier un ribosome unique en le fixant à une surface, ouvrant la voie à des études plus poussées. Nous décrirons ensuite les expériences sur des ribosomes accrochés spécifiquement à une surface, où des observations en smFRET ont permis de donner des informations quantitatives sur les changements conformationnels du ribosome [17, 18, 19, 20]. La spécificité de l'accroche des ribosomes a permis de faire des observations sur leur activité qui sont indépendantes de l'accroche, et reproductibles. Cette étape est particulièrement importante pour la mise au point de nos expériences où nous cherchons à éviter les interactions non spécifiques. Nous décrirons finalement les expériences sur des traductions d'ARNm complètes, c'est-à-dire avec plusieurs cycles d'élongation, qui ont été effectuées soit en pince optique [21], soit en microscopie de fluorescence par la synthèse d'une protéine fluorescente du type GFP [22, 23]. Ces expériences sont un nouveau pas vers l'étude la traduction, car jusqu'à présent, les expériences menées s'étaient limitées à l'incorporation de deux acides aminés par le ribosome. Elles permettent d'appréhender les interactions ribosome-ARNm, une des vocations de notre projet expérimental. Pour une revue générale des expériences réalisées en molécule unique sur le ribosome, on peut se reporter à deux articles de revue [24, 25].

1.3.1 Premières expériences *in vitro* avec un ribosome bactérien actif fixé à une surface.

Durant ces dix dernières années de nombreux progrès ont été réalisés dans l'accrochage de ribosomes actifs à une surface. La première expérience a été réalisée dans le groupe de M. Ehrenberg en 1999. Il s'agissait d'étudier l'étape d'initiation et plus particulièrement l'association des deux sous-unités 30S et 50S sur l'ARNm [26]. Dans cette expérience, on n'observe pas le ribosome en molécule unique, mais en SPR (Surface Plasmon Resonance). Ici, l'ARNm est fixé chimiquement à une surface d'or, et la densité de molécules biologiques présentes à la surface est observée par SPR. L'initiation est rendue plus difficile avec un ARNt^{fMet} (sans acide aminé) qu'avec un fMet-ARNt^{fMet}, et est quasi-nulle sans ARNt^{fMet}. De plus, en présence d'IF3, la sous-unité 50S a des difficultés à se lier à la sous-unité 30S, mais une fraction y parvient quand même, ce qui était contraire aux prévisions. En effet, IF3 intervient dans le cycle de traduction pour dissocier les deux sous-unités.

La première expérience en microscopie de fluorescence de molécule unique sur des ribosomes a été effectuée dans le groupe de R. M. Hochstrasser [14] (University of Pennsylvania). Des ribosomes bactériens complexés à un ARNm poly-U sont adsorbés

non spécifiquement à une surface de mica. Les Met-ARNt^{fMet} sont marqués sur le groupe α -amino de la méthionine par une tétraméthylrhodamine (TMR). Lors de la formation du complexe, TMR-Met-ARNt^{fMet} se place dans le site P du ribosome. On voit alors les ribosomes sur la surface en microscopie de fluorescence (Figure 1.7). Lorsqu'on rajoute de la puromycine dans l'échantillon, le signal de fluorescence disparaît. En effet, la puromycine est un antibiotique qui se comporte comme un ARNt déacylé. Elle entre dans le ribosome par le site A et elle entraîne la terminaison prématurée de la protéine en se liant à celle-ci dans le centre peptidyl-transférase. Ici, cela se traduit par le relargage du TMR-Met-ARNt^{fMet} lié à la puromycine (d'où la disparition de la fluorescence). Quand les auteurs ajoutent un Phe-ARNt^{Phe} (qui se place dans le site A), codé par UUU, à la suite du TMR-Met-ARNt^{fMet}, la puromycine ne peut plus agir, car le site A est occupé. La fluorescence est toujours présente. Les auteurs concluent que leurs ribosomes conservent bien une activité, même s'ils n'observent pas un cycle d'élongation complet.

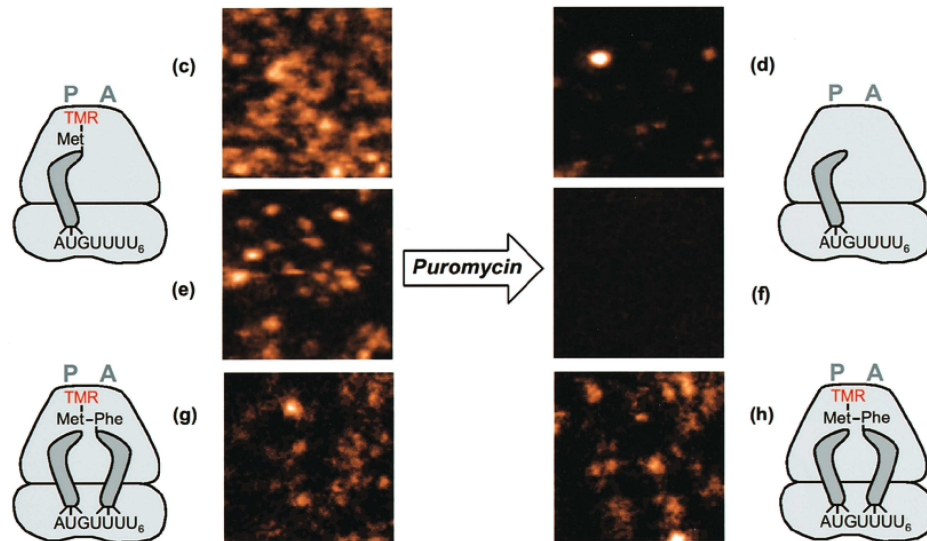


FIG. 1.7 – Images en fluorescence de complexes ribosomes/ARNm contenant un TMR-Met-ARNt^{fMet} lié au site P avant ((c) et (e)) et après ((d) et (f)) réaction avec la puromycine. La puromycine agit sur le ribosome en terminant prématurément la protéine, ce qui se traduit ici par la perte de TMR-Met-ARNt^{fMet} ((d) et (f)). (g) et (h) : Images en fluorescence de complexes ribosomes/ARNm avec TMR-Met-ARNt^{fMet} dans le site P et Phe-ARNt^{Phe} dans le site A, avant (g) et après (h) injection de puromycine. On voit que l'ajout d'un Phe-ARNt^{Phe} dans le site A empêche l'action de la puromycine. Les ribosomes sont incubés 1 minute dans (c) et 5 secondes dans (e) et (g), d'où la différence de densité à la surface. Images issues de [14]

Ces expériences, bien qu'elles prouvent l'activité de ribosomes adsorbés à une surface, présentent un inconvénient majeur. Comme les ribosomes sont adsorbés à la surface, seulement 10% d'entre eux sont actifs. De plus, ceux qui sont actifs présentent une activité qui est loin d'être comparable à celle de ribosomes en solution. L'adsorption présentant un caractère aléatoire, car l'accroche est non spécifique, ces expériences sont de plus difficiles à répéter. Il a donc été nécessaire de trouver un moyen d'accrocher spécifiquement les ribosomes à la surface.

1.3.2 Etudes des changements conformationnels du ribosome lors de la traduction.

Nous allons présenter différents travaux, utilisant plus particulièrement le FRET comme outil pour observer les changements conformationnels. Nous parlerons d'abord de la première étude en FRET [17], publiée en 2004 par les groupes de J.D. Puglisi et de S. Chu à Stanford. Celle-ci portait sur la sélection dans le site A de l'ARNt chargé correspondant au codon de l'ARNm, et sur la dynamique des ARNt dans les sites A et P. Elle a été suivie d'un autre article approfondissant les premiers travaux [18]. Nous parlerons ensuite des études portant sur la rotation des deux sous-unités du ribosome l'une par rapport à l'autre pendant la traduction, menées dans le groupe de T. Ha (Urbana-Champaign) [19] et de J.D. Puglisi [20]. Ces deux études nous montrent que les expériences en molécule unique n'apportent pas forcément une réponse absolue. D'autres travaux ont été effectués, mais nous ne les présenterons pas, car ces travaux sont plus éloignés de notre approche expérimentale. On peut citer les travaux sur le mouvement de la protéine ribosomale L1, qui maintient l'ARNt dans le site P pendant le cycle d'élongation, effectués dans les groupes de R. L. Gonzalez Jr (Columbia) [27] et de T. Ha [28], des travaux provenant de chez J. D. Puglisi sur le rôle du facteur d'initiation IF2 dans la formation du complexe 70S sur l'ARNm [29], puis ceux de chez R. L. Gonzalez Jr sur la terminaison de la protéine et le recyclage du ribosome [30].

Etudes sur la sélection de l'ARNt chargé dans le site A.

Dans l'article de S. Blanchard *et al.* [17], les auteurs se sont intéressés à l'étape de sélection de l'ARNt chargé dans le site A. En effet, cette étape, la première dans le cycle d'élongation, permet au ribosome d'avoir un taux d'erreur très faible. Pour expliquer la grande fidélité de la traduction, ils ont mesuré le temps de résidence du complexe EF-Tu/aa-ARNt^{aa} au niveau du site A pour un ARNt correspondant au codon de l'ARNm, pour un ARNt ayant un nucléotide de différence avec le codon de l'ARNm, et un complètement différent de l'ARNm. Pour effectuer ces mesures, ils ont marqué deux ARNt avec un fluorophore organique, l'ARNt^{fMet} et l'ARNt^{Phe}, respectivement avec un Cy3 et un Cy5. L'ARNt chargé Met-ARNt^{fMet} est placé dans le site P lors de l'étape d'initiation. Un complexe ARNm/ribosome avec Met-ARNt^{fMet} dans le site P est préparé en solution puis fixé spécifiquement sur une lamelle. La lamelle a subi une préparation délicate pour qu'il n'y ait pas d'interaction non spécifiques avec les autres facteurs (voir Chapitre 4). La durée de résidence de l'ARNt chargé Phe-ARNt^{Phe} complexé à EF-Tu dans le site A est mesurée par smFRET entre le Cy5 de Phe-ARNt^{Phe} et le Cy3 de Met-ARNt^{fMet}. De plus, l'efficacité de FRET renseigne directement sur la distance entre les deux ARNt. Les auteurs ont déduit de ces mesures des informations sur la dynamique de l'incorporation de Phe-ARNt^{Phe} dans le site A, et la formation de la liaison peptidique entre fMet et Phe.

Ce résultat est important, car c'est le premier obtenu en microscopie de fluorescence de molécule unique où on observe un cycle d'élongation complet. Dans [14], les auteurs ont observé que le ribosome était capable d'incorporer un ARNt marqué, mais ils n'avaient pas observé un cycle d'élongation complet. De plus, Blanchard *et al.* ont pu fixer de façon spécifique un ribosome à la surface en conservant son activité. D'ailleurs l'incorporation de Phe-ARNt^{Phe} se fait sur des ribosomes fixés à la lamelle de microscope via un ARNm biotinylé en 5'.

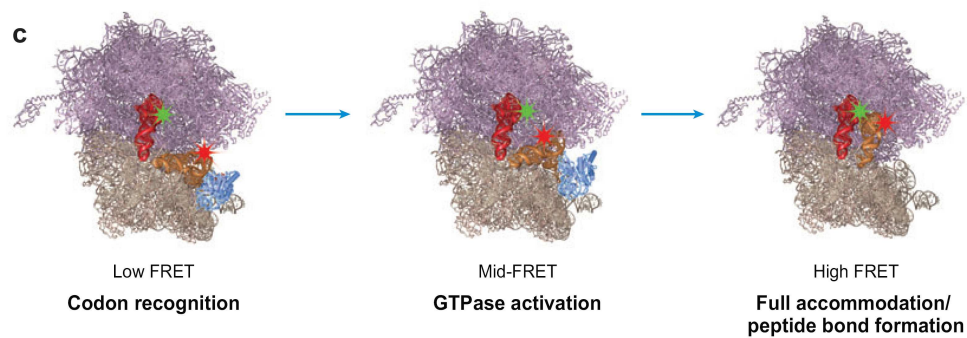


FIG. 1.8 – *Interprétation de l'expérience présentée dans l'article de S. Blanchard et al. [17]. Cette interprétation est issue des données en structure à haute résolution confrontées aux données en smFRET. On voit les différentes étapes de l'incorporation d'un ARNt chargé dans le ribosome, de la reconnaissance du codon (faible intensité de FRET) jusqu'à la liaison peptidique avec l'acide aminé précédemment incorporé (forte intensité de FRET). En bleu est représenté EF-Tu qui apporte l'ARNt chargé jusqu'au site A du ribosome. En rouge et marron, on a représenté les deux ARNt marqués. Si la reconnaissance marche, EF-Tu est relâché par hydrolyse de son GTP (étape intermédiaire, moyenne intensité de FRET). Image issue de [24].*

Etude sur la rotation de la petite sous-unité par rapport à la grande sous-unité pendant le cycle d'élongation.

Deux études ont été effectuées sur ce sujet par deux groupes différents. La première a été effectuée dans le groupe de T. Ha en collaboration avec le groupe de H. Noller [19]. Dans ce travail, les auteurs marquent des protéines ribosomales (avec Cy3 et Cy5), une sur chaque sous-unité, suffisamment proches pour avoir un signal de FRET, quel que soit le changement de conformation des ribosomes. Ils utilisent des ribosomes "reconstitués", c'est à dire qu'ils font produire par une bactérie des ribosomes sans les protéines à marquer, celles-ci étant incorporées dans le ribosome après avoir été marquées avec les deux marqueurs fluorescents organiques. D'après leurs signaux de FRET, ils déduisent deux états conformationnels dans le ribosome, correspondant à une rotation de la petite sous-unité par rapport à la grande sous-unité. Dans la discussion, ils exposent que la rotation est spontanée et est autorisée dans les deux sens.

La seconde étude, effectuée dans le groupe de J. D. Puglisi [20], présente des résultats en désaccord avec celle-ci. Elle justifie les résultats du groupe de T. Ha en disant que la protéine ribosomale choisie pour être marquée sur la grande sous-unité est trop proche de la protéine L1. En effet, cette dernière a une position qui fluctue spontanément [27], et cela pourrait influencer sur les signaux observés dans la référence [19]. Dans la seconde expérience, les auteurs marquent l'ARN ribosomal (sur chaque sous-unité) avec un Cy3 et un Cy5. Les deux sites choisis sont loin d'une zone active du ribosome pendant la traduction. Ils n'observent pas de rotations spontanées. Au contraire, celles-ci sont pilotées par différentes réactions chimiques. Un schéma résume ces différentes rotations pendant la traduction (Figure 1.9).

Ces deux études sur le même sujet sont très instructives sur la manière dont doivent être menées des expériences en molécule unique. En effet, celles-ci présentent des conclusions différentes, probablement issues de la méthode utilisée pour marquer les deux sous-unités du ribosome. Les résultats observés avec des systèmes aussi complexes que le ribosome, où de nombreux facteurs entrent en jeu et où de nombreuses étapes composent chaque cycle de la traduction, montrent qu'il faut être très prudent et croiser de nombreuses données issues de différentes expériences pour parvenir à une conclusion.

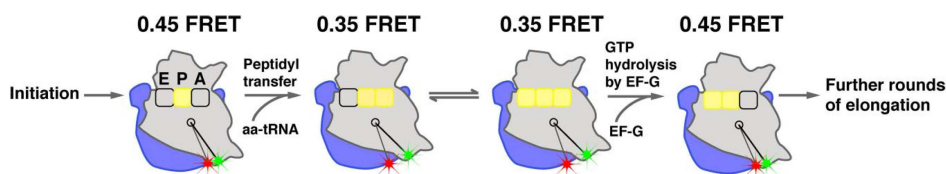


FIG. 1.9 – *Modèle de la dynamique des mouvements entre les deux sous-unités du ribosome pendant la traduction, d'après Marshall et al. [20]. Les deux sous-unités du ribosome sont marquées par des fluorophores Cy3 et Cy5, respectivement représentés par deux étoiles verte et rouge. Après l'association des deux sous-unités pendant l'étape d'initiation, le ribosome (en gris et bleu) avec l'ARNt initiateur (en jaune) dans le site P est prêt pour l'élongation. Cette conformation donne un taux de FRET de 0,45. Lorsqu'un nouvel ARNt chargé arrive dans le site A, la liaison peptidique avec l'acide aminé dans le site P se fait rapidement. Il en résulte une rotation de la petite sous-unité dans le sens contraire des aiguilles d'une montre par rapport à la grande sous-unité, donnant un taux de FRET de 0,35. Ce changement de conformation va faciliter le mouvement des ARNt des sites A vers P et P vers E pendant la translocation. Tant que celle-ci n'a pas eu lieu, les ARNt vont fluctuer entre ces deux positions, conformément à [18]. L'arrivée de EF-G va catalyser la translocation par hydrolyse du GTP, et va entraîner une rotation de la petite sous-unité vers son état initial (taux de FRET 0,45). Le ribosome est à nouveau prêt pour l'incorporation d'un nouvel acide aminé.*

Deux études ont aussi été effectuées sur les mouvements de la protéine ribosomale L1 pendant le cycle d'élongation par les groupes de R. L. Gonzalez Jr [27] et de T. Ha [28]. Nous ne les présenterons pas, mais nous faisons juste observer que ces deux études présentent aussi des différences sur les résultats et leurs interprétations, notamment sur la fréquence des mouvements de L1. Là encore, les méthodes utilisées pour placer les deux marqueurs fluorescents utilisés pour les mesures en FRET diffèrent et peuvent expliquer cette différence.

1.3.3 Etudes de la traduction sur plusieurs cycles d'élongation.

Nous allons maintenant décrire des expériences qui ne ciblent plus la dynamique du ribosome en soit, c'est-à-dire les changements conformationnels intra-ribosome, mais plutôt les expériences visant le repliement de la protéine synthétisée et les interactions entre le ribosome et l'ARNm. Ces observations nécessitent une traduction complète de l'ARNm par le ribosome, ou du moins plusieurs cycles d'élongation, contrairement aux études précédentes où tout s'effectue sur un seul cycle d'élongation.

Observation de la traduction codon par codon en molécule unique.

Une seule expérience a montré la traduction codon par codon en molécule unique jusqu'à présent. Cette expérience a été réalisée en collaboration par les équipes de Ignacio Tinoco Jr (Berkeley), Harry Noller (Santa Cruz) et C. Bustamante (Berkeley) [21]. A l'aide d'une pince optique, les auteurs ont pu observer le ribosome traduire un ARNm codon par codon. Pour ce faire, ils ont conçu une séquence d'ARNm présentant une structure dite en "tige-boucle", c'est-à-dire qu'une partie de la séquence est complémentaire de la partie qui suit et que les deux se lient par appariement Watson-Crick. Ce genre de structures est courant dans la nature, le ribosome est capable de les ouvrir grâce à son activité

hélicase⁵ pour ensuite traduire la séquence. L'avantage de cette méthode pour observer la traduction est de ne pas à avoir à muter le ribosome pour le fixer. On utilise un ribosome sauvage, donc il n'y a pas de modification du ribosome qui pourrait entraîner une altération de son activité traductionnelle. Ici, on observe l'ouverture de la tige-boucle par le ribosome en piégeant les deux extrémités de la séquence d'ARNm, donc en mesurant la distance entre les deux extrémités (voir Figure 1.10). Pour être plus précis, on applique une force constante au piège, inférieure à la force de cohésion de la tige-boucle de l'ARNm. On applique une rétroaction sur la position du piège pour que quand le ribosome ouvre la tige boucle, le piège soit déplacé pour garder la force appliquée constante. On mesure ainsi les déplacements du piège pour mesurer le déplacement du ribosome.

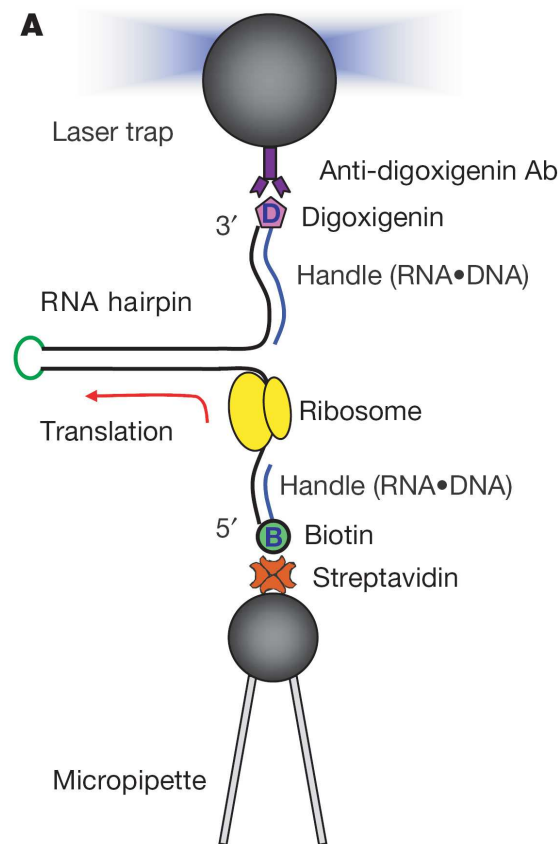


FIG. 1.10 – Schéma de l'expérience de l'article [21]. L'ARNm est fixé à chaque extrémité par deux billes, une étant piégée par la pince optique, l'autre étant fixée à l'aide d'une micropipette. La pince qui piège la bille doit se déplacer pour maintenir une force constante. Le ribosome est complexé à l'ARNm juste en amont de la tige-boucle. Le déplacement de la bille dans le piège renseigne sur la dynamique de traduction et l'avancée du ribosome sur l'ARNm.

Cette distance augmente au fur et à mesure de la traduction, d'exactly 6 nucléotides pour chaque translocation. En effet, quand le ribosome ouvre la tige-boucle pour lire un codon, il désapparie en fait un codon avec son brin complémentaire. La distance entre chaque extrémité de l'ARNm augmente donc de l'équivalent de deux codons. En modifiant la tige-boucle en y plaçant des séquences ayant une liaison plus stable avec

⁵Une hélicase est une protéine capable de catalyser l'ouverture d'acides nucléiques (ADN ou ARN) appariés sous forme de doubles brins.

(Berlin), T. Choli-Papadopoulou (Thessalonique), J. Fitter (Jülich) et M. Gerrits (Berlin), les auteurs ont aussi synthétisé une protéine GFP, la GFPem [23]. Celle-ci a une maturation encore plus rapide que l'uvGFP, soit en 5 minutes environ. Ils ont utilisé un ribosome ayant un autre type de mutation. Ici, le ribosome a subi une modification sur la protéine ribosomale L4, située sur la grande sous-unité, pour y incorporer une biotine. Ils peuvent ainsi fixer le ribosome à la surface via une streptavidine (voir Figure 5.4). La séquence de l'ARNm de la GFP comporte les mêmes modifications que pour l'expérience de [22]. Ici, l'objectif est de valider l'activité en molécule unique de ce ribosome muté, fixé directement à la surface. Le ribosome est marqué non-spécifiquement avec des ATTO 655 via des fonctions NHS réagissant avec les fonctions amines des lysines des protéines ribosomales. Les auteurs colocalisent la fluorescence des ATTO 655 et des GFP synthétisées. Là aussi, les auteurs estiment la vitesse de traduction et de maturation de la GFPem.

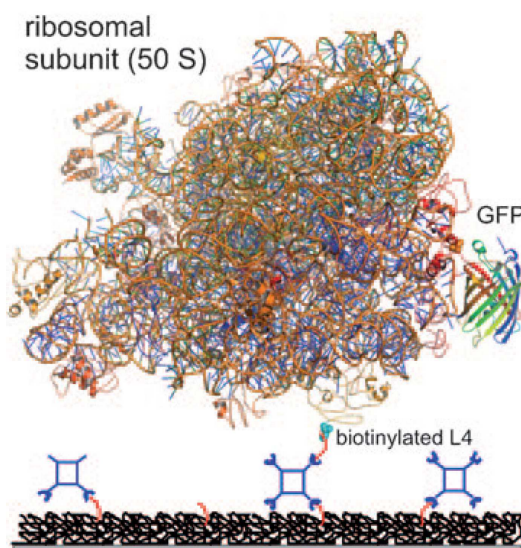


FIG. 1.12 – Schéma de la sous-unité 50S du ribosome muté pour avoir une biotine sur la protéine ribosomale L4. On voit représentée sur la droite du ribosome la protéine GFP synthétisée. Ce ribosome est accroché via la biotine à une surface PEG-biotine-streptavidine. Image issue de [23].

L'intérêt de cette seconde expérience sur la traduction d'une GFP provient de l'accroche du ribosome à la surface. L'accroche du ribosome à la lamelle de microscope par la biotine sur la protéine L4 ne gêne pas l'activité traductionnelle des ribosomes. C'est un nouveau moyen de modifier et d'accrocher un ribosome à une lamelle pour des expériences en molécule unique.

Cette expérience est d'autant plus intéressante pour nous que nous utilisons une méthode similaire pour muter et marquer le ribosome.

1.3.4 Conclusion sur l'état de l'art.

Dans la présentation de ces expériences, nous avons montré l'évolution des études sur le ribosome en molécule unique. Les premières ont commencé avec des ribosomes accrochés non spécifiquement à une surface. Ces études ont montré que l'accroche à la surface des ribosomes pouvait être problématique si elle était réalisée de cette façon. Les expériences qui ont suivi, notamment en smFRET, ont tâché de remédier à ce problème via

une fonctionnalisation de surface délicate, ce qui a permis d'avoir une bonne reproductibilité des expériences, et une activité non dépendante de l'accroche, comme dans les cas précédents. Ces observations en smFRET ont apporté des réponses sur les changements conformationnels du ribosome pendant la traduction, mais ont aussi montré leur limite dans l'interprétation des données. Leur réalisation nécessite donc beaucoup de précautions, tout comme l'analyse des données, surtout avec un système aussi complexe que le ribosome, où plusieurs états de conformations différentes peuvent se succéder. Enfin, les dernières expériences, portant sur la traduction d'ARNm complet, ont pour perspective de travailler sur les interactions ARNm-ribosome ou sur le repliement en cours de traduction des protéines.

1.4 Problématique biologique de notre étude.

Notre projet expérimental vise à mieux comprendre les interactions entre le ribosome et l'ARNm lors de la synthèse d'une protéine. En effet, de nombreux processus interviennent via cette interaction. On peut citer l'exemple de certains ARNm viraux, qui comportent une structure secondaire provoquant un glissement du ribosome d'un nucléotide vers l'extrémité 5' (amont) (ou 3', aval), appelé "décalage de phase de lecture", avec une certaine efficacité (voir Figure 1.13). Ce type de structure permet la synthèse de deux protéines différentes suivant qu'il y a un décalage de la phase de lecture ou pas.

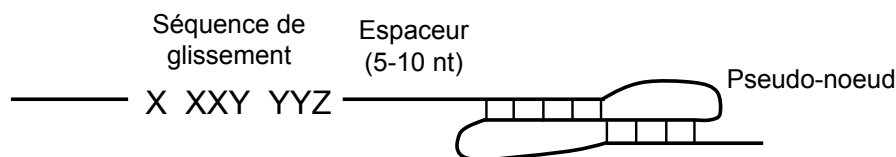


FIG. 1.13 – Représentation schématique d'une séquence d'ARNm provoquant un décalage de la phase de lecture d'un nucléotide. Ici, la structure de l'ARNm est du type pseudo-noeud, c'est-à-dire qu'il y a deux séquences d'hybridation avec des appariements du type Watson-Crick sur l'ARNm. Le décalage de la phase de lecture d'un nucléotide se fait sur la séquence de glissement, en amont du pseudo-noeud. La séquence lue initialement est X XXY YYZ, puis après glissement devient XXX YYY Z. X peut être n'importe quel nucléotide, Y est de l'adénine ou de l'uracile, et Z n'est généralement pas de la guanine. Il y a un espaceur de 5 à 10 nucléotides entre la séquence de glissement et le pseudo-noeud. Ce genre de séquence a une grande efficacité de décalage de phase de lecture.

Ces processus seraient accessibles par différentes voies. Dans l'article de Wen *et al.* [21], les auteurs ont déjà réussi à observer la traduction d'un ARNm codon par codon. Les auteurs ont aussi pu étudier l'interaction de différentes structures de l'ARNm avec le ribosome. Ils proposent d'utiliser leur méthode pour observer le glissement du ribosome sur l'ARNm. Cette méthode, quoi que très élégante pose plusieurs problèmes. Comme nous l'avons présenté plus haut, le taux de glissement du ribosome n'est pas de 1 sur les structures de l'ARNm concerné. En effet, le but de ces structures est de permettre la synthèse de deux protéines différentes à partir de la même séquence d'ARNm. Dans ce type d'expérience en pince optique, une force constante est appliquée sur l'ARNm. Même si cette force n'est pas suffisante pour déplier la structure secondaire de l'ARNm, on peut légitimement se demander si cette force ne va pas influencer sur les résultats. Par ailleurs, il faut une grande statistique pour observer les deux cas (glissement ou non), car le taux de glissement peut être relativement faible (autour du %), et cela est peu aisé

avec une observation en pince optique, où on a une mesure par expérience. Cela tend à apporter une solution en microscopie de fluorescence en molécule unique, où aucune force n'est appliquée et où on peut faire un grand nombre d'observations en une seule mesure (observation en champ large).

Pour étudier ce phénomène biologique, nous souhaitons marquer les acides aminés avec un fluorophore suffisamment petit pour ne pas perturber la traduction. Ainsi, avec une séquence de l'ARNm qui permet un décalage de la phase de lecture par glissement du ribosome, il suffira de modifier la séquence en aval pour qu'elle autorise l'incorporation d'un acide aminé fluorescent ou pas, suivant qu'il y ait ou pas glissement du ribosome.

Avant de réaliser ce projet, il faut observer la traduction d'un ARNm sans structure secondaire en incorporant des acides aminés marqués dans la chaîne polypeptidique. On souhaite aussi marquer le ribosome avec un autre marqueur fluorescent. La colocalisation des deux marqueurs (ribosome et acides aminés) certifiera l'activité traductionnelle (voir Figure 1.14).

Donc nous devons développer un moyen d'observer simultanément plusieurs ribosomes, ainsi que leurs activités traductionnelles, en microscopie de fluorescence.

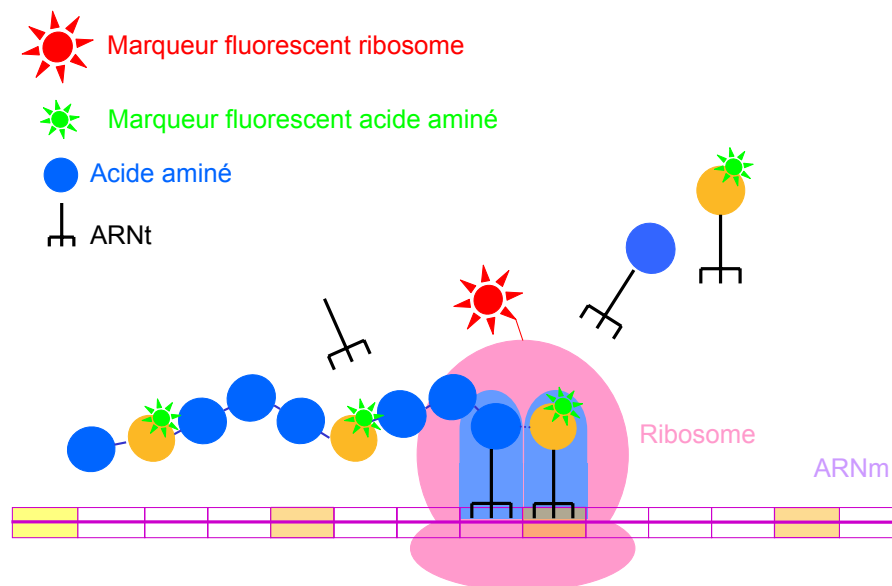


FIG. 1.14 – Schéma de l'incorporation d'acides aminés marqués lors de la synthèse d'une protéine par un ribosome marqué.

Le marquage du ribosome doit se faire de façon spécifique car il ne doit pas perturber l'activité traductionnelle du ribosome. Nous allons réaliser une modification spécifique du ribosome pour y cibler la zone à marquer. L'objectif est double. Il faut premièrement observer en molécule unique l'activité traductionnelle d'un ribosome portant une étiquette, puis, deuxièmement, la traduction d'un ARNm en incorporant des acides aminés marqués. Ce sont les étapes nécessaires avant d'aborder des expériences portant sur les interactions ribosome/ARNm.

Chapitre 2

Dispositif de microscopie de fluorescence pour l'observation et l'analyse de molécules uniques.

Dans ce chapitre, nous allons décrire le système optique de microscopie de fluorescence utilisé dans nos expériences, ainsi que la pertinence du choix de la microscopie TIRF dans le cadre de nos études. Nous présenterons ensuite une étude théorique de l'excitation par ondes évanescentes et nous détaillerons l'influence de la polarisation du laser exciteur. Ceci nous permettra de déterminer les caractéristiques du champ évanescent vu par les fluorophores. Nous présenterons aussi la méthode d'analyse que nous utilisons pour caractériser des fluorophores organiques. Ce travail sera ensuite appliqué à l'étude de la photophysique en molécule unique du Bodipy FL, qui fera l'objet du chapitre suivant.

2.1 Choix de la microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRFM). Choix du montage en TIRFM

2.1.1 Choix du type de microscopie de fluorescence.

Cette expérience a pour but d'observer la cinétique de synthèse d'une protéine par le ribosome en molécule unique. Afin de prouver que nous observons bien cette synthèse, nous devons co-localiser le ribosome et les acides aminés incorporés par celui-ci. Nous marquons les acides aminés lysines à l'aide d'un petit fluorophore, le Bodipy FL, et les ribosomes avec un QD. Pour pouvoir observer l'incorporation des acides aminés marqués au cours du temps, il nous faut répondre à différents critères :

1. Il faut être capable d'observer longtemps (plusieurs minutes, voir dizaines de minutes) ce système biologique sans le perdre dans la solution. Il faut donc impérativement le fixer à un substrat. Le plus simple en apparence semble de l'accrocher à la surface de la lamelle de microscope.
2. La technique de microscopie de fluorescence utilisée doit autoriser une concentration en acides aminés marqués la plus grande possible, pour envisager l'observation de la traduction en temps réel dans des conditions aussi proches que possibles de celles *in vivo*. On doit donc avoir le plus petit volume d'observation possible.
3. Il est préférable d'observer plusieurs complexes ribosome-ARNm-protéine uniques à la fois, afin d'obtenir rapidement une grande statistique, sans utiliser une trop

grande quantité de réactifs. En effet, une étude en temps réel de la traduction implique qu'on ne peut faire qu'une observation par échantillon.

Nous allons comparer quelques techniques classiques de microscopie de fluorescence en molécule unique pour déterminer la plus performante pour notre expérience par rapport à nos critères. On peut séparer ces techniques en deux catégories : celles qui font une image point par point, par balayage de la surface, et celles qui font une image en une seule prise, dites en champ large.

Techniques de microscopie de fluorescence point par point.

Il s'agit essentiellement des microscopies confocale et multi-photonique. Le faisceau laser d'excitation est focalisé à la limite de diffraction de l'objectif dans l'échantillon. On excite ainsi les molécules fluorescentes présentes dans le volume confocal. Voyons si ces deux méthodes répondent à nos critères. En ce qui concerne le critère d'observation de longue durée, elles sont utilisables pour un échantillon fixé à la surface. Si l'échantillon diffuse lentement (en augmentant artificiellement la viscosité du milieu, avec du glycérol par exemple), on peut très bien observer sur une longue période de temps un système biologique non fixé à la surface, mais cela n'est pas applicable dans un système où plusieurs molécules travaillent de concert (comme dans le cas de la traduction). Pour le deuxième critère, celui de la concentration maximale d'acides aminés marqués, la concentration maximale en acides aminés est de quelques picomoles/litre, limitée par la taille du volume confocal d'observation, sans être saturé par un fond de fluorescence trop important, car on excite sur tout l'axe optique en confocal. L'utilisation d'un trou de filtrage permet de collecter uniquement les photons provenant de molécules se situant sur une profondeur de 500 nm autour du point de focalisation. La microscopie bi-photonique apporte une légère amélioration, le volume confocal y étant plus petit suivant l'axe optique (de l'ordre de la moitié de la longueur d'onde [32]) car l'excitation du marqueur suit un processus non linéaire. Dans ce cas, on n'a pas besoin de trou de filtrage. Pour le troisième critère, concernant l'observation de l'évolution de plusieurs complexes biologiques simultanément, cela est rendu très difficile par la prise d'image point par point de la zone d'intérêt.

Techniques de microscopie de fluorescence en champ large.

Nous allons décrire comparativement la microscopie en épifluorescence et la microscopie de fluorescence en réflexion totale (TIRFM). Ces deux méthodes permettent d'exciter une zone de l'échantillon typiquement de diamètre 100 μm . En épifluorescence, on excite l'échantillon avec un faisceau parallèle dans toute la profondeur de l'échantillon. On collecte par transmission ou par réflexion la fluorescence émise en la séparant du laser d'excitation avec un jeu de filtres. Dans le cas de la microscopie TIRF, le faisceau collimaté est totalement réfléchi à l'interface verre (lamelle couvre-objet) - eau (échantillon biologique), créant une onde évanescence au point d'incidence. Le laser ne traverse pas tout l'échantillon, il n'y a pas d'excitation pour les molécules situées au delà de 100 nm de l'interface typiquement. Ces deux techniques passent sans problème le premier critère, il est d'ailleurs nécessaire de fixer l'échantillon biologique à la surface en TIRFM à cause de la faible profondeur d'excitation de cette technique. Par contre, le second critère, la concentration en acides aminés marqués, est fatal pour la microscopie en épifluorescence. En effet, ici nous excitons l'échantillon dans toute sa profondeur, soit environ 100 μm dans notre cas. Le fond de fluorescence sera ici rédhibitoire. En TIRFM, on est de loin dans les meilleures conditions. Avec une profondeur d'excitation d'environ 100 nm, on peut atteindre des concentrations d'environ 10 nM en acides aminés marqués avant d'avoir un fond de fluorescence supérieur au signal d'une molécule unique. Pour déterminer cette valeur de 10 nM, on prend en compte le cylindre dont la section est la limite de diffraction

de l'objectif à la longueur d'onde d'émission du fluorophore, la hauteur étant la profondeur d'excitation de l'onde évanescente (≈ 100 nm). Ce volume ne doit contenir qu'une seule molécule fluorescente. Pour le troisième critère, vu que notre technique d'observation est en champ large, nous pouvons observer une grande zone (soit plusieurs milliers de micromètres carrés) contenant une centaine de ribosomes marqués fixés à la surface, discernables les uns des autres.

Conclusion sur les différentes méthodes. La microscopie TIRF est clairement la plus adaptée à notre étude. Ce choix s'est d'ailleurs imposé dans de nombreuses études sur le ribosome en microscopie de fluorescence de molécules uniques [24].

2.1.2 Les montages de microscopie TIRF.

Nous allons décrire les deux dispositifs expérimentaux généralement proposés pour la microscopie TIRF [33].

Un premier montage consiste à générer une onde évanescente avec un faisceau incident sur l'interface verre eau via un prisme de verre (Figure 2.1). La fluorescence est récoltée de l'autre côté de l'échantillon par un objectif de microscope à immersion dans l'eau. L'excitation et la détection sont découplées. En effet l'objectif ne sert qu'à collecter le signal de fluorescence vers une caméra sensible.

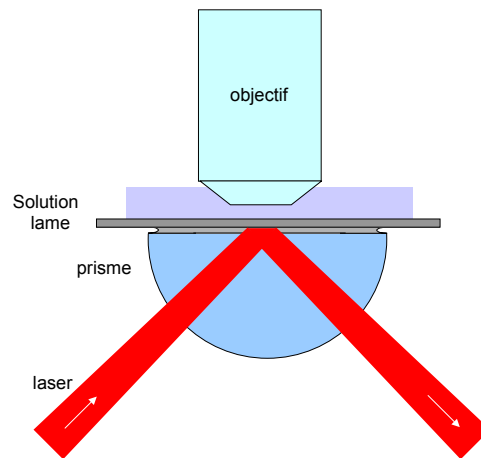


FIG. 2.1 – *Principe expérimental de la microscopie TIRF avec un prisme.* L'objectif est à immersion dans l'eau et est directement plongé dans la solution où est présent l'échantillon. Il n'y a pas d'interface entre le prisme et la lame, car une huile d'indice égal à celui du verre est disposée entre les deux.

Le second montage permet l'excitation et la détection par la même voie (Figure 2.2). La réflexion totale du faisceau incident se fait grâce à un objectif de microscope à très grande ouverture numérique (ON), car à immersion dans de l'huile d'indice ($n = 1,515$). Il a fallu attendre le développement d'objectifs à immersion dans l'huile de grande ON et de grande qualité optique pour pouvoir utiliser ce montage [33]. Ainsi, nous parvenons à une ON de 1,45 (on peut atteindre 1,60 dans des conditions très particulières pour les meilleurs objectifs), soit un angle limite d'ouverture de $73,2^\circ$ avec les objectifs Olympus x60 et Zeiss x100. Sachant que l'angle critique en réflexion totale est de $65,5^\circ$ pour une

2.1. CHOIX DE LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE PAR RÉFLEXION TOTALE (TIRF)

interface verre eau ¹, nous pouvons obtenir une réflexion totale avec ces objectifs. Les photons d'excitation et de fluorescence sont séparés à l'aide d'un miroir dichroïque situé entre la caméra et l'objectif (voir plus loin). On utilise ici un microscope inversé, par souci de commodité.

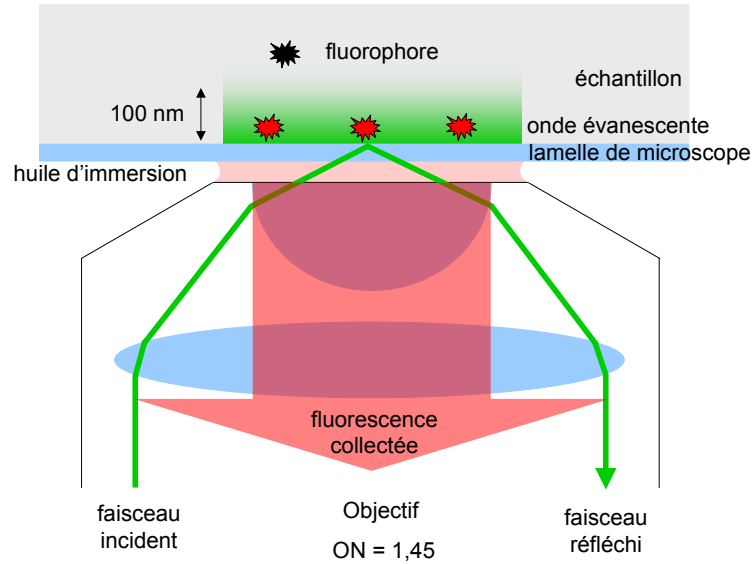


FIG. 2.2 – Schéma de principe de la microscopie par onde évanescente à travers un objectif. Cette figure présente la formation de l'onde évanescente à l'interface verre ($n_1 = 1,516$) eau ($n_2 = 1,38$), par l'intermédiaire d'un objectif de microscope ($O.N. = 1,45$). Le faisceau entre dans l'objectif décalé par rapport à l'axe optique, de façon à avoir un angle d'incidence sur l'interface verre-eau supérieur ou égal à $65,5^\circ$, l'angle critique. La réflexion de cette onde incidente à l'interface crée une onde évanescente. Celle-ci excite les fluorophores sur une centaine de nanomètres, son amplitude décroissant de manière exponentielle dans la direction orthogonale à la surface. Les fluorophores excités sont en rouge, celui qui n'est pas excité est en noir. La fluorescence émise est collectée par le même objectif.

Ces deux montages présentent divers intérêts. Dans le cas d'un système optique avec prisme, on peut contrôler aisément l'angle d'incidence, et donc calibrer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans l'échantillon [34]. C'est particulièrement intéressant dans l'observation de cellules vivantes, où on peut observer différentes couches de la cellule (on est quand même limité par l'extension de l'onde évanescente). L'autre intérêt est de pouvoir travailler avec un système microfluidique à débit continu sans perdre la mise au point [35]. La raison est simple : dans le cas du prisme, l'échantillon peut être disposé sur une lame de microscope (épaisseur de 1 mm). Celle-ci est peu sensible aux déformations dues à l'injection d'un liquide dans la cellule, donc on ne perd pas la mise au point sur l'échantillon au cours de l'observation.

Dans le cas d'un système utilisant le même objectif pour exciter et collecter la fluorescence, l'intérêt principal est de laisser libre la zone supérieure de l'échantillon pour un autre montage optique. Dans le cas d'une expérience couplant microscopie TIRF et pince optique, cette géométrie est très utile pour placer le montage de détection de la pince optique (avec une configuration utilisant une photodiode à 4 quadrants) [36]. Dans notre étude, nous souhaitons développer un tel montage, pour pouvoir observer nos systèmes

¹Indice de réfraction du verre : 1,516. Indice de réfraction du milieu physiologique (eau salée) : 1,38

biologiques sous une contrainte mécanique. D'autre part, dans le cas d'une étude microfluidique plus complexe, on peut utiliser des cellules microfluidiques élaborées en PDMS, permettant une grande versatilité dans l'élaboration des canaux. Ces raisons nous ont amenés à utiliser un système de microscopie de fluorescence par réflexion totale avec un objectif.

2.2 Principe de la microscopie TIRF.

La microscopie TIRF est basée sur l'existence d'une onde évanescente créée par la réflexion totale à l'interface verre/eau. Lorsqu'un faisceau de lumière rencontre une interface entre deux milieux d'indices différents, il se sépare en deux parties, l'une réfractée et l'autre réfléchi (Figure 2.3-A). Ce résultat est contenu dans les lois de Snell-Descartes pour la réflexion et la réfraction. Pour la réflexion, nous avons $i_1 = -i_r$, avec i_r l'angle du faisceau réfléchi. Pour la réfraction, on a : $n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2$. On peut définir un angle critique i_c à partir duquel le faisceau incident est réfléchi totalement (Figure 2.3-B) tel que : $\frac{n_1}{n_2} \sin i_c > 1$. A l'emplacement de cette réflexion totale, une onde évanescente est créée, par continuité du champ électromagnétique. Cette onde se propage suivant le plan de l'interface, et s'atténue de façon exponentielle dans le plan orthogonal à l'interface.

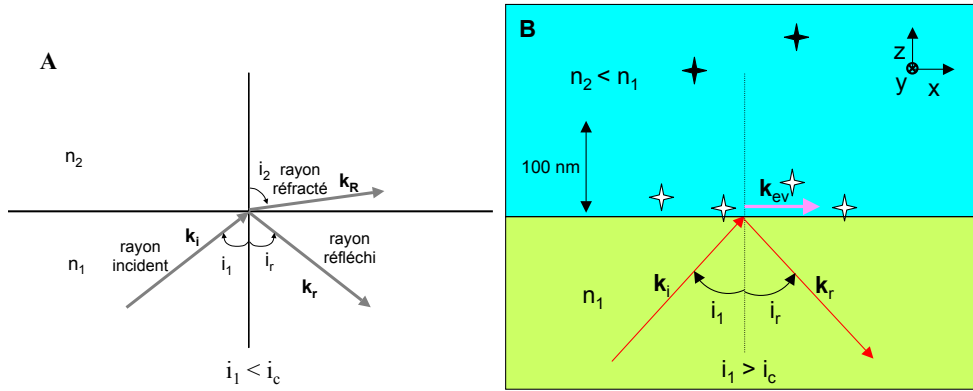


FIG. 2.3 – Onde incidente à l'interface de deux diélectriques : réfraction et réflexion. (A) Si l'onde incidente rencontre l'interface avec un angle inférieur à l'angle critique prédit par la loi de Snell-Descartes, il y a alors un faisceau réfléchi et un faisceau réfracté. (B) Par contre, si l'angle d'incidence est supérieur à l'angle critique, l'onde est réfléchi totalement. Au point d'incidence, il va se former une onde dite évanescente, se propageant suivant l'interface. Cette onde va exciter les fluorophores (étoiles blanches) sur une faible profondeur (environ 100 nm), mais pas ceux situés au-dessus (étoiles noires). Les ondes sont représentées par leurs vecteurs d'onde respectifs.

On définit le faisceau incident par son champ électrique tel que :

$$\vec{E}_1 = \mathcal{E}_1 \vec{\epsilon}_1 e^{i(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} - \omega t)} + c.c. \quad (2.1)$$

où $\mathcal{E}_1$ est l'amplitude du champ, $\vec{\epsilon}_1$ sa polarisation, $\vec{k}_1$ son vecteur d'onde et ω sa pulsation. Dans un premier temps, nous ne tiendrons pas compte de la polarisation des champs (incident, réfléchi et évanescent). Nous allons calculer et définir l'amplitude du champ évanescent à partir du champ incident défini ci-dessus et des indices de réfraction n_1 et n_2 des milieux 1 et 2 respectivement.

2.2.1 Description du champ évanescent.

On se place dans le cas où $i_1 > i_c$. Le champ incident défini par l'équation (2.1) crée un champ évanescent à l'interface, car $i_1 > i_c$ tel que :

$$\vec{E}_{ev} = \mathcal{E}_{ev} \vec{\epsilon}_{ev} e^{i(\vec{k}_{ev} \cdot \vec{r} - \omega t)} + c.c. \quad (2.2)$$

Pour caractériser ce champ évanescent, on doit déterminer $\vec{k}_{ev}$, et donc l'angle i_2 pour définir ses composantes suivant les axes de notre référentiel. A partir de l'équation de Snell-Descartes, nous avons :

$$n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2, \text{ soit } \sin i_2 = \frac{n_1}{n_2} \sin i_1$$

Si $i_1 > i_c$, on a :

$$\begin{aligned} \sin i_2 &= \frac{n_1}{n_2} \sin i_1 > 1 \\ \sin^2 i_2 &= \left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 \end{aligned}$$

Ainsi

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

Comme le terme de droite est négatif,

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

Seule la valeur positive permet d'avoir une valeur finie de l'amplitude du champ électrique, donc

$$\cos i_2 = i \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1} \quad (2.3)$$

Nous pouvons maintenant projeter le vecteur d'onde du champ évanescent $\vec{k}_{ev}$ suivant les axes du plan d'incidence (Figure 2.3-B) :

$$\vec{k}_{ev} = k_x \vec{e}_x + k_z \vec{e}_z$$

avec

$$k_x = k_1 \sin i_1$$

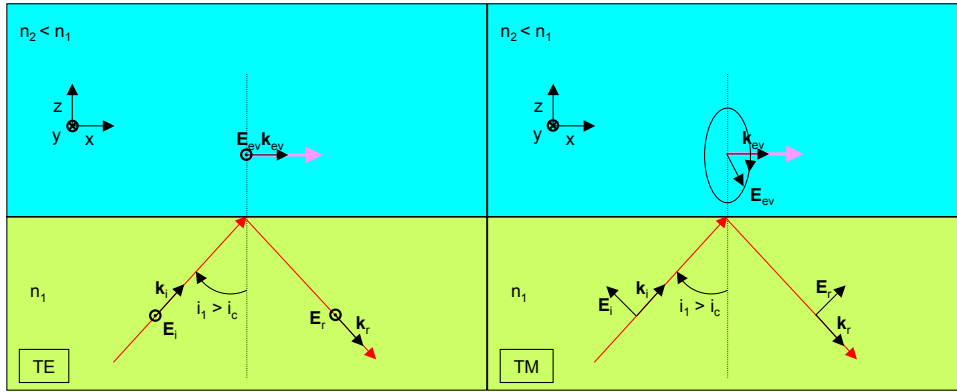


FIG. 2.4 – Réflexion d'une onde plane polarisée soit TE, soit TM. L'encadré TE décrit le cas où la polarisation est transverse électrique, c'est-à-dire avec le champ électrique orthogonal au plan d'incidence, qui se réfléchit totalement sur l'interface des milieux 1 et 2, avec $n_1 > n_2$. Dans l'encadré TM, nous avons une onde incidente transverse magnétique, c'est-à-dire avec le champ électrique dans le plan d'incidence. Les directions des champs électrique et magnétique et du vecteur d'onde de chacune des ondes (incidente, réfléchie et évanescente) sont indiquées sur la figure. L'ellipse représente une polarisation dans le plan d'incidence.

et

$$k_z = i\mathcal{K} \text{ avec } \mathcal{K} = k_1 \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1\right)^2 - 1} \quad (2.4)$$

En remplaçant k_{ev} par ses composantes, nous avons l'expression suivante du champ électrique évanescent :

$$\vec{E}_{ev} = \mathcal{E}_{ev} \vec{\epsilon}_{ev} e^{-\mathcal{K}z} e^{i(k_x x - \omega t)} + c.c. \quad (2.5)$$

Le caractère évanescent de cette onde apparaît dans le terme en exponentielle décroissante. On remarquera que l'onde se propage suivant l'interface (axe x), et s'atténue exponentiellement dans le milieu 2 (axe z). Dans notre dispositif expérimental, le milieu 1 est la lamelle de verre ($n_1 = 1,516$), le milieu 2 est l'eau salée ($n_2 = 1,38$) dans laquelle se trouve l'échantillon. Pour une longueur d'onde de 488 nm à un angle d'incidence de 67° , nous avons une profondeur de pénétration du champ évanescent (pour une diminution du champ d'un facteur e) : $\frac{1}{\mathcal{K}} = 340$ nm. Si on prend en compte le carré du champ évanescent, il diminue d'un facteur e après avoir parcouru 170 nm dans l'échantillon. Ces valeurs sont fortement dépendantes de l'angle d'incidence.

Nous avons caractérisé le champ évanescent issu d'une réflexion totale sur l'interface. Il est maintenant intéressant de connaître l'influence de la polarisation de l'onde incidente sur celle du champ évanescent, car elle importe dans l'excitation des marqueurs fluorescents.

2.2.2 Efficacité d'excitation : amplitude et polarisation du champ évanescent.

La polarisation du champ évanescent revêt une importance particulière, car elle influe sur l'efficacité de l'excitation des marqueurs. En effet, le marqueur étant assimilé à

un dipôle, celui-ci absorbera d'autant mieux les photons polarisés parallèlement à l'axe du dipôle. Il convient donc de déterminer au préalable la meilleure polarisation pour le champ incident. On distinguera deux cas de polarisation linéaire : le cas Transverse Electrique (TE), avec le champ électrique orthogonal au plan d'incidence, et le cas Transverse Magnétique (TM) avec le champ électrique dans le plan d'incidence (Figure 2.4). Pour chacun de ces cas, on déterminera les facteurs de transmission de l'onde incidente. Toute autre forme de polarisation incidente est une combinaison de ces deux cas, on peut donc généraliser pour une polarisation quelconque à partir des calculs qui vont suivre.

Cas d'une polarisation incidente TE.

Dans le cas d'une polarisation TE, le champ électrique incident est orthogonal au plan d'incidence (Figure 2.4). Dans ce cas, il s'écrit :

$$\vec{E}_1^{TE} = \mathcal{E}_1^{TE} \vec{e}_y e^{i(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} - \omega t)} + c.c.$$

Par continuité de la composante transverse du champ $\vec{E}$, on sait que le champ évanescent aura la même polarisation que le champ incident, soit :

$$\vec{E}_{ev}^{TE} = \mathcal{E}_{ev}^{TE} \vec{e}_y e^{-\kappa z} e^{i(k_x x - \omega t)} + c.c. \quad (2.6)$$

Nous devons maintenant déterminer les facteurs de transmission à prendre en compte pour connaître l'amplitude du champ évanescent $\mathcal{E}_{ev}^{TE}$. Pour relier les champs électriques aux intensités, il faut prendre garde à l'indice du milieu. Pour cela, il nous faut considérer la première entrée du faisceau incident dans le verre, même s'il n'y a pas de perte (traitement anti-reflet). Cela implique un coefficient de Fresnel de transmission t_{01} pour le passage de l'air au verre, issu de la conservation de l'énergie au passage des deux milieux :

$$\begin{aligned} I_0 &= I_1 \\ cn_0 \epsilon_0 \|E_0\|^2 &= cn_1 \epsilon_0 \|E_1\|^2 \\ \frac{\|E_1\|^2}{\|E_0\|^2} &= \frac{1}{n_1} \end{aligned}$$

Soit

$$t_{01} = \frac{E_1}{E_0} = \frac{1}{\sqrt{n_1}} \quad (2.7)$$

L'amplitude de l'onde se propageant dans l'objectif s'écrit :

$$\mathcal{E}_1^{TE} = t_{01} \mathcal{E}_0 \text{ avec } t_{01} = \frac{1}{\sqrt{n_1}}$$

L'onde est ensuite réfléchié totalement sur l'interface verre/eau, et génère une onde évanescente. On peut calculer le facteur de transmission (coefficient de Fresnel) t_{12}^{TE} , avec lequel nous connaissons l'amplitude finale de l'onde évanescente. Le champ évanescent est défini tel que dans l'équation (2.5). On remarque qu'il est polarisé linéairement, orthogonal au plan d'incidence.

D'après la littérature [37], on obtient le coefficient de transmission suivant :

$$t_{12}^{TE} = \frac{E_{ev}^{TE}}{E_1^{TE}} = \frac{2n_1 \cos i_1}{n_1 \cos i_1 + n_2 \cos i_2}$$

Soit

$$t_{12}^{TE} = \frac{E_{ev}^{TE}}{E_1^{TE}} = \frac{2n_1 \cos i_1}{n_1 \cos i_1 + n_2 i \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1\right)^2 - 1}} \quad (2.8)$$

Le carré du module de ce coefficient de Fresnel nous donne :

$$\|t_{12}^{TE}\|^2 = \frac{4n_1^2 \cos^2 i_1}{n_1^2 - n_2^2} \quad (2.9)$$

De là, nous obtenons le coefficient de transmission en intensité entre le faisceau entrant dans l'objectif et l'"intensité" du champ évanescent définie comme $cn_2\epsilon_0 \|E_{ev}^{TE}\|^2$:

$$T^{TE} = \frac{I_{ev}^{TE}}{I_0^{TE}} = \|t_{01}\|^2 \|t_{12}^{TE}\|^2 \quad (2.10)$$

Après simplifications,

$$T^{TE} = \frac{4n_1 \cos^2 i_1}{n_1^2 - n_2^2} \quad (2.11)$$

Ce coefficient de transmission est supérieur à 1 pour les différentes valeurs de l'angle d'incidence (Figure 2.5), mais cela n'a rien de choquant car nous considérons une onde évanescente, celle-ci ne transporte pas d'énergie, le vecteur de Poynting étant nul. Il n'y a pas violation du principe de conservation de l'énergie.

Cas d'une polarisation TM.

Nous partons ici d'une onde incidente dont le champ électrique se décompose suivant les axes (Ox) et (Oz). Cette onde s'écrit sous la forme :

$$\vec{E}_1^{TM} = \vec{\mathcal{E}}_1^{TM} e^{i(k_1 \cdot \vec{r} - \omega t)} + c.c. \quad (2.12)$$

Avec,

$$\vec{\mathcal{E}}_1^{TM} = \mathcal{E}_1^{TM} \begin{pmatrix} -\cos i_1 \\ 0 \\ \sin i_1 \end{pmatrix} \quad (2.13)$$

En appliquant les lois de Snell-Descartes pour la réflexion totale, comme dans le cas TE, nous obtenons l'équation du champ électrique de l'onde évanescente telle que :

$$\vec{E}_{ev}^{TM} = \mathcal{E}_{ev}^{TM} \vec{\epsilon}_{ev}^{TM} e^{-\mathcal{K}z} e^{i(k_x x - \omega t)} + c.c.$$

En projetant les différentes composantes vectorielles du champ évanescent, nous pouvons écrire que la polarisation est parallèle à :

$$\begin{pmatrix} -i \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1\right)^2 - 1} \\ 0 \\ \frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \end{pmatrix} \quad (2.14)$$

Pour définir proprement la polarisation, nous normalisons ce vecteur, et nous obtenons :

$$\vec{\epsilon}_{ev}^{TM} = \frac{1}{\sqrt{2 \left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1}} \begin{pmatrix} -i \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1} \\ 0 \\ \frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \end{pmatrix} \quad (2.15)$$

Ce champ est polarisé elliptiquement dans le plan d'incidence.

L'amplitude est alors définie comme il suit :

$$\mathcal{E}_{ev}^{TM} = t_{12}^{TM} \mathcal{E}_1^{TM} \sqrt{2 \left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1}$$

D'après la littérature [37], on a le coefficient de Fresnel suivant pour un champ incident polarisé TM à l'interface de deux milieux d'indices n_1 et n_2 , $n_1 > n_2$:

$$t_{12}^{TM} = \frac{2n_1 \cos i_1}{n_2 \cos i_1 + i n_1 \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1}} \quad (2.16)$$

$$\|t_{12}^{TM}\|^2 = \frac{4n_1^2 \cos^2 i_1}{n_2^2 \cos^2 i_1 + n_1^2 \left[\left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1 \right]} \quad (2.17)$$

Nous avons ainsi le coefficient de transmission total suivant, en tenant compte du coefficient de transmission du passage de l'air au verre $t_{01} = \frac{1}{\sqrt{n_1}}$:

$$T^{TM} = \frac{\|E_{ev}^{TM}\|^2}{\|E_0\|^2} = \|t_{12}^{TM}\|^2 \|t_{01}\|^2 \left(2 \left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1 \right) \quad (2.18)$$

$$T^{TM} = \frac{\|t_{12}^{TM}\|^2}{n_1} \left(2 \left(\frac{n_1}{n_2} \sin i_1 \right)^2 - 1 \right) \quad (2.19)$$

Les valeurs des coefficients de transmission en polarisation TE et TM sont reportées sur le graphique Figure 2.5.

Remarques :

- le facteur de transmission est toujours plus grand en TM qu'en TE. Il serait donc préférable d'exciter les marqueurs en TM.
- De plus, une onde incidente TM produit une onde évanescente polarisée elliptiquement. Il reste à caractériser l'ellipticité de cette polarisation pour trouver la meilleure configuration pour exciter les fluorophores.

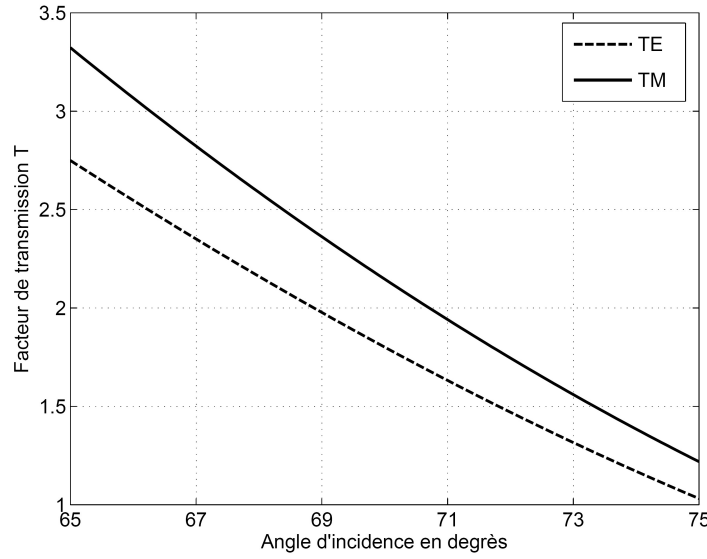


FIG. 2.5 – Evolution du facteur de transmission en intensité pour une onde incidente polarisée TE ou TM en fonction de l'angle d'incidence. Nous faisons varier l'angle d'incidence de l'angle critique de réflexion totale $i_c=65,5^\circ$ au demi-angle d'ouverture maximale de l'objectif $i_{max}=73^\circ$. On voit que le facteur de transmission est plus grand en polarisation TM de l'onde incidente qu'en polarisation TE.

2.2.3 Evolution de la polarisation suivant l'angle d'incidence en configuration TM.

Dans le cas TE, la polarisation de l'onde évanescente n'évolue pas en fonction de l'angle d'incidence. Elle est linéaire, orthogonale au plan d'incidence, quel que soit l'angle. Le cas TM est plus complexe, car l'amplitude des composantes du champ évanescent évolue en fonction de l'angle d'incidence. On mesure le rapport d'ellipticité de la polarisation de l'onde évanescente (on fait le rapport des composantes du champ évanescent suivant x et suivant z), comme dans la Figure 2.6.

On remarque que la polarisation du champ est quasiment linéaire suivant z quand l'angle d'incidence est près de l'angle critique de réflexion totale, pour devenir elliptique en augmentant l'angle jusqu'à l'angle limite d'ouverture. On ne peut jamais atteindre une polarisation circulaire à cause de l'ouverture numérique de l'objectif.

D'autre part, le fait que la polarisation TM est linéaire suivant z n'est pas intéressant pour optimiser la collection de la fluorescence des marqueurs. En effet, les dipôles les mieux excités sont parallèles au champ électrique (perpendiculaire à l'interface), ceux-ci émettant orthogonalement à leur axe. Un dipôle n'émettant pas de photons suivant son axe, on ne doit pas collecter de photons pour un fluorophore orthogonal à l'interface. Le calcul de la collection de la fluorescence d'un tel dipôle, avec l'O.N. de 1,45 de notre objectif de microscope (angle d'ouverture de 73°), donne malgré tout une efficacité de collection de 29% des photons émis. En effet, on collecte toujours un nombre important de photons grâce à notre grande ouverture numérique. Dans le meilleur des cas, c'est-à-dire pour un dipôle parallèle à l'interface, nous collectons 40% des photons émis². Il semblerait donc plus intéressant de se placer dans une configuration TE, afin d'optimiser la collection (voir schéma de la Figure 2.7), mais il faut prendre aussi en compte le coefficient de Fresnel, qui est inférieur de 16% en TE par rapport au cas TM, pour un angle d'incidence à 66° .

²On a considéré le cas très simple d'un dipôle émettant dans un milieu isotrope. L'interface modifie probablement le diagramme d'émission

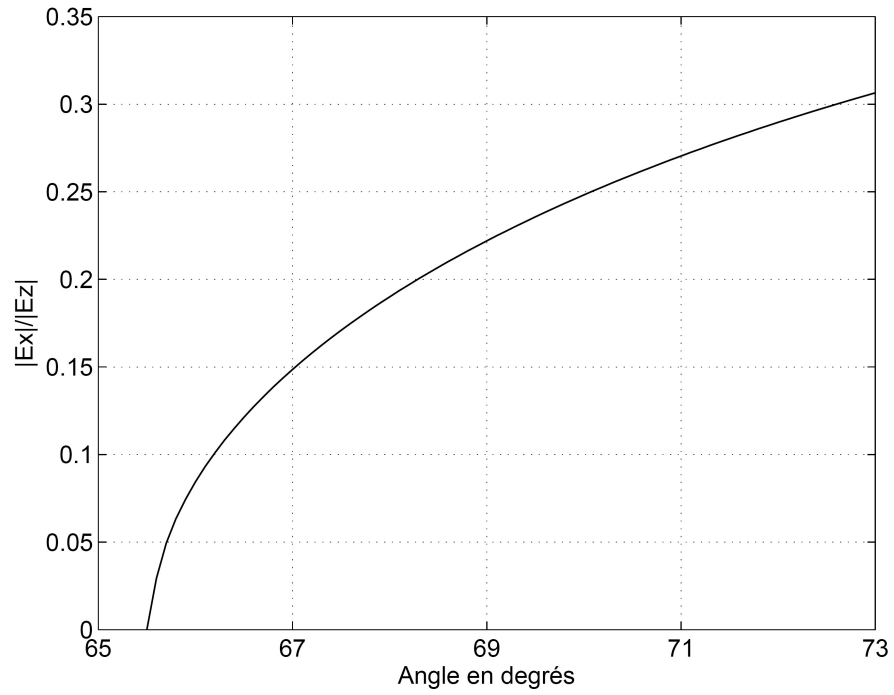


FIG. 2.6 – Evolution de l'ellipticité du champ évanescent en configuration TM en fonction de l'angle d'incidence. On fait le rapport des amplitudes du champ suivant x et suivant z . L'angle critique de réflexion totale est de $65,5^\circ$, l'angle limite d'ouverture de l'objectif est de 73° .

Donc, à intensité de faisceau laser incident égale, il n'y a pas une grande différence entre les deux configurations, du point de vue du rapport signal sur bruit.

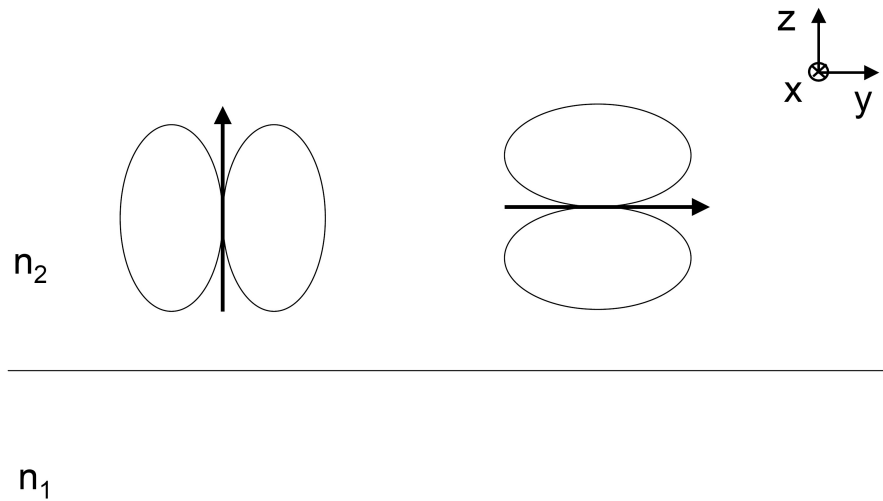


FIG. 2.7 – Schéma d'un dipôle rayonnant perpendiculaire à l'interface (gauche), excité par un champ polarisé suivant z (polarisation TM, près de l'angle critique de réflexion totale) et cas d'un dipôle rayonnant parallèle à la surface (droite), excité par un champ polarisé suivant y (polarisation TE). On a représenté très grossièrement le diagramme de rayonnement du dipôle.

2.3 Description du montage optique utilisé dans notre expérience.

Notre montage est basé sur un microscope inversé Olympus IX 70, sur la tourelle duquel est monté un objectif Olympus planApo (grossissement $\times 60$, $ON = 1,45$) à immersion dans l'huile (Immersion oil fluorescence free, Fluka). Les lasers sont amenés à l'objectif de microscope via le port d'épifluorescence du bâti. Nous utilisons divers lasers d'excitation : un laser solide YAG doublé à 532 nm (Crysta Laser, continu 100 mW non polarisé), un laser saphir doublé à 488 nm (488-200 CDRH, Coherent, continu 200 mW polarisé), une diode laser rouge à 638 nm (DL-5038-021, Sanyo, continu 17 mW) sur une monture faite "maison", ou un He-Ne (35 mW, Thorlabs, polarisé) à 632,8 nm. La synchronisation de l'excitation et de l'acquisition est réalisée à l'aide d'un "séquenceur" développé par André Villing (ingénieur CNRS, LCFIO).

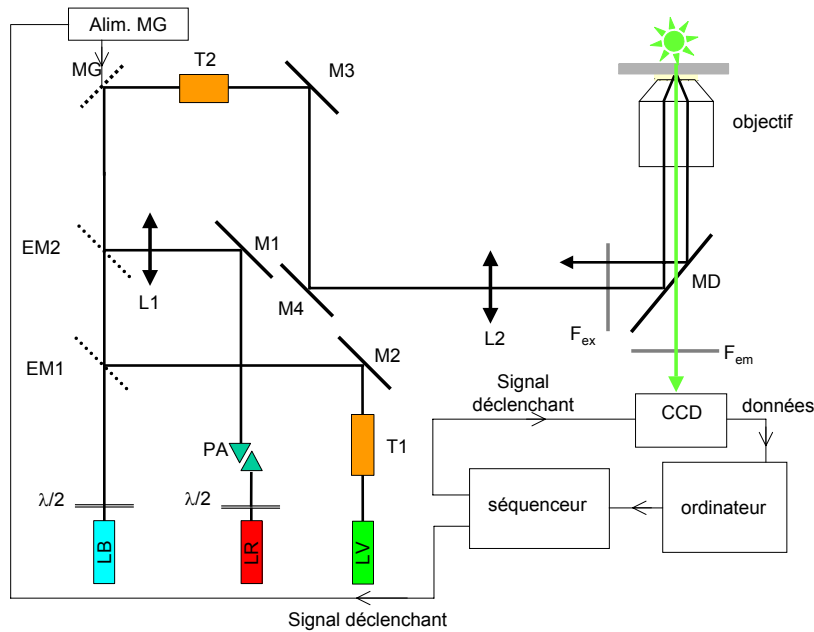


FIG. 2.8 – Schéma du banc optique de microscopie de fluorescence. LB désigne le laser à 488 nm, LR le laser à 638 nm, LV le laser à 532 nm. PA désigne les prismes anamorphoteurs mettant en forme le faisceau de la diode laser à 638 nm. Nous l'avons remplacé sur les dernières expériences par un laser He-Ne délivrant 35 mW à $\lambda = 632,8$ nm. F_{ex} , filtre d'excitation, épure spectralement le laser d'excitation. F_{em} , filtre d'émission, élimine les photons hors du spectre de fluorescence. EM1 et EM2 désignent les miroirs montés sur des montures électriques basculantes afin de changer la longueur d'onde d'excitation. Une lentille L1 est placée sur le trajet du faisceau rouge pour compenser le chromatisme du télescope T2, afocal pour $\lambda = 488$ nm. MG désigne le miroir galvanométrique. L2 est un doublet achromatique dont le plan focal image est confondu avec le plan focal objet de l'objectif. Il sert à décaler le faisceau par rapport à l'axe optique de l'objectif. Les faisceaux laser sont agrandis à l'aide de T2 et dirigés vers le port d'épifluorescence du microscope inversé (par les miroirs M3 et M4). A l'interface verre-eau, le laser est réfléchi totalement, créant une onde évanescente excitant les fluorophores (étoile verte). La fluorescence émise est collectée par le même objectif, puis imagée par une caméra CCD sensible. La longueur d'onde d'excitation est rejetée par le miroir dichroïque et le filtre d'émission.

Le montage expérimental est représenté sur la Figure 2.8. Les trois lasers nous permettent d'exciter différents marqueurs, mais on n'éclaire l'échantillon qu'avec un laser à la fois. Ils sont tous les trois superposés sur le miroir galvanométrique et parcourent

le même chemin optique par la suite. Ce miroir galvanométrique nous permet de synchroniser l'excitation des marqueurs avec l'acquisition du signal émis. Ainsi, pendant le temps mort entre deux prises d'images successives, l'échantillon n'est pas éclairé et nous pouvons observer plus longtemps les marqueurs. On appellera 1 la position du miroir galvanométrique pour laquelle l'échantillon est éclairé, et 0 celle pour laquelle il ne l'est pas. La synchronisation entre le miroir galvanométrique et la caméra est effectuée à l'aide du séquenceur, piloté depuis l'ordinateur par un logiciel réalisé sous LabView 8.2 (National Instrument). Ce système nous permet de réaliser des films avec une durée d'exposition minimale de 5 ms (limité par le temps de basculement du miroir galvanométrique) et un temps de pause minimal entre chaque image de 10 ms (limité par le temps de transfert des données de la CCD vers l'ordinateur). La synthèse d'une protéine dans des conditions optimales se faisant à une vitesse de un acide aminé toutes les 50 ms, nous ne serons pas limités par la rapidité d'acquisition de notre système.

Lorsque le miroir galvanométrique est en position 1, le faisceau est agrandi par un télescope x10 ou x5 (Linos) pour avoir la dimension et l'intensité d'excitation voulues sur l'échantillon. Il est ensuite dirigé vers le port d'épifluorescence du microscope, via un doublet achromatique ($f = 300$ mm) dont le plan focal image est confondu avec le plan focal objet de l'objectif. Ce doublet achromatique permettra de décaler le faisceau de l'axe optique de l'objectif. Le faisceau est ensuite réfléchi par un miroir dichroïque vers l'objectif. Puis il est dévié par les optiques de l'objectif, et arrive sur l'interface verre-eau collimaté avec un angle supérieur à l'angle critique de réflexion totale. Le faisceau réfléchi refait le trajet aller dans le sens inverse, légèrement décalé (Figure 2.9).

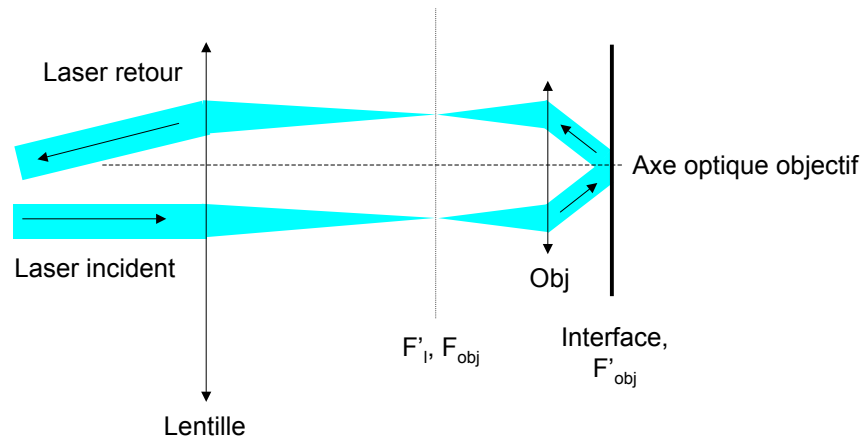


FIG. 2.9 – Schéma de la propagation du faisceau laser incident et du faisceau laser réfléchi dans un système de microscopie de fluorescence en réflexion totale à l'aide d'un objectif. F'_l est le foyer image de la lentille (doublet achromatique dans notre cas) et F_{obj} est le foyer objet de l'objectif de microscope. F'_{obj} est le foyer image de l'objectif.

La fluorescence émise est collectée par l'objectif de microscope vers une caméra CCD sensible (EM-CCD C9100, Hamamatsu). Dans ces conditions d'observation, un pixel de la caméra correspond à 130 nm dans le plan de l'échantillon. Un filtre passe-haut ou passe-bande (le filtre d'émission), situé en dessous du miroir dichroïque, permet de rejeter les photons hors du spectre de fluorescence des marqueurs et non déviés par le miroir dichroïque.

Pour chaque marqueur observé, nous avons un ensemble filtre d'émission, miroir dichroïque et filtre d'excitation correspondant, ayant des caractéristiques spécifiques pour chacun d'eux.

2.4 Observation de molécules uniques fluorescentes.

Pour pouvoir observer et étudier des molécules uniques avec le dispositif que nous venons de décrire, il faut encore :

- Optimiser le rapport signal sur bruit en ayant l'échantillon le plus propre possible afin de diminuer les sources de fluorescence parasite. En effet, quand on observe des molécules uniques, le signal est intrinsèquement limité par le taux de fluorescence de la molécule. Il faut donc diminuer les sources de fluorescence parasite pour avoir un bruit minimal.
- Discriminer les molécules fluorescentes uniques de la pollution restante par le traitement des images. Certaines propriétés physiques des fluorophores organiques (dont le Bodipy FL) les distinguent d'autres systèmes fluorescents. Nous pouvons élaborer des critères de sélection à partir de ces propriétés, que nous allons présenter afin de distinguer ces fluorophores organiques du fond et de ne sélectionner que les marqueurs recherchés.

2.4.1 Optimisation du signal collecté.

Optimisation des paramètres expérimentaux pour la détection de molécules uniques fluorescentes.

Dans la détection de molécules uniques fluorescentes, le principal problème est d'avoir un signal supérieur au bruit. Comme nous observons des émetteurs uniques, le signal collecté est faible, correspondant à quelques centaines, voire milliers, de photons. Il est intrinsèquement limité par la durée de la transition radiative de l'état excité vers l'état fondamental ($\approx$ nanoseconde). Donc on a au mieux 10^9 photons/s émis. Plusieurs paramètres entrent en jeu dans l'optimisation du signal. Tout d'abord, il faut exciter le plus efficacement possible les fluorophores, c'est-à-dire avoir le signal le plus intense possible, avec le minimum d'intensité d'excitation. Dans un paragraphe précédent, nous avons vu l'influence de la polarisation du faisceau incident, ainsi que du facteur de transmission de l'onde évanescente. Dans le cas d'un dispositif de microscopie de fluorescence avec des fluorophores sans orientation définie, la polarisation a peu d'influence. Il est en général préférable d'avoir un système ayant une polarisation la plus circulaire possible, pour exciter au mieux les dipôles, quelles que soient leurs orientations. L'angle d'incidence à l'interface joue aussi un rôle, car l'efficacité de transmission vers l'onde évanescente sera d'autant meilleure qu'on est proche de l'angle critique.

Il faut aussi améliorer autant que possible la collection. Pour cela, il faut choisir un objectif ayant la plus grande ouverture numérique possible, pour collecter un nombre maximal de photons. Dans notre expérience, l'ouverture est très grande car on doit aussi atteindre un grand angle d'incidence pour réaliser la réflexion totale. D'autre part, la transmission des objectifs doit être très bonne dans le visible. Les filtres et miroir dichroïque disposés pour séparer la fluorescence du laser d'excitation doivent avoir de bonnes caractéristiques de transmission et de réflexion pour ne pas perdre de photons.

Le choix du détecteur revêt aussi une importance particulière. Celui-ci doit être très sensible dans le visible, c'est-à-dire avoir une excellente efficacité quantique (on peut atteindre 95% avec certaines caméras). Le bruit de lecture et le courant d'obscurité doivent être très faibles. D'autre part, les caméras avec un étage d'amplification (electron multiplier : EM) sont aussi intéressantes pour des sources émettant très peu de photons (moins de 100 photons collectés pour le temps d'acquisition minimal de notre système).

La confection de l'échantillon est une étape clé. Il est impératif d'utiliser des solutions pures. Donc nos dilutions sont effectuées avec de l'eau ultrapure milliQ (résistivité : 18,2 M Ω), les produits sont purs et ne contiennent pas d'impuretés fluorescentes. L'autre étape

est de diminuer le fond provenant d'autres sources. Normalement, si les filtres et le miroir dichroïque sont bien choisis, nous n'avons pas de fond dû au laser d'excitation. Les échantillons étant conçus entre deux lames de verre, une lamelle couvre-objet et une lame porte-objet, nous devons les nettoyer avec soin, particulièrement la lamelle couvre-objet. L'échantillon biologique étant disposé sur cette dernière, toute impureté restante sur cette lamelle sera imagée lors de la prise de données. La Figure 2.10 nous montre le résultat d'un nettoyage efficace sur une lamelle. Celle sortie de la boîte présente beaucoup d'impuretés. Un passage dans un plasma d'oxygène (plasma cleaner, Dietner), à 0,4 mbar de pression d'oxygène, permet d'éliminer la majorité des impuretés présentes. Pour améliorer cette méthode, un traitement préalable dans un bain d'acétone dans une cuve à ultra-sons qui permet d'enlever tous les corps gras et/ou volumineux, de la lamelle, est effectué. Les lamelles sont conservées plusieurs semaines dans des tubes en plastique étanches sans dégradation du fond.

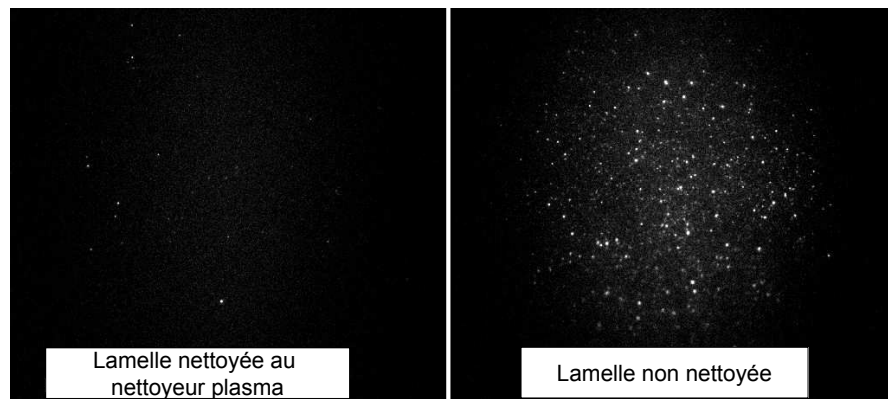


FIG. 2.10 – Image en TIRFM de la surface d'une lamelle nettoyée au nettoyeur plasma à gauche, et d'une lamelle non nettoyée, sortie de la boîte telle quelle, à droite. Excitation à $\lambda = 488 \text{ nm}$, $I = 1500 \text{ W/cm}^2$, durée d'acquisition : 100 ms.

Malgré toutes ces précautions, on observe toujours un fond résiduel au niveau de la réflexion du faisceau laser. Nous allons déterminer sa provenance et l'étudier.

2.4.2 Origine du fond de fluorescence résiduel.

On peut légitimement se poser la question de la provenance du fond observé (Figure 2.11). Nous avons deux hypothèses : la fluorescence des impuretés de la lamelle couvre objet et la diffusion du faisceau laser excitateur sur cette même lamelle. Cette dernière possibilité est peu probable, car le filtre d'émission utilisé a une transmission de 10^{-6} à la longueur d'onde du laser d'excitation. Pour conclure, nous avons mesuré le spectre du fond résiduel à l'aide d'un spectromètre à fibre à la sortie du microscope, à la place de la caméra CCD. On réalise plusieurs échantillons avec différentes lamelles couvre-objets, toutes certifiées par le fournisseur "faible fluorescence". Elles ont été nettoyées au nettoyeur plasma, n'ont donc plus d'impuretés fluorescentes à la surface. L'échantillon est rempli d'eau milliQ. On excite à 488 nm et on utilise un filtre d'émission passe-bande. On ne détecte pas de signal à la longueur d'onde du laser, 488nm (Figure 2.12). Par contre, on peut observer un signal "important" dans la bande spectrale autorisée par le filtre. Ce signal évolue sensiblement suivant la lamelle utilisée, mais reste bien au delà du signal observé en dehors de la zone autorisée par le filtre, limité par le bruit de photons. On voit bien que la diffusion du laser n'est en rien responsable du fond observé. Ce fond

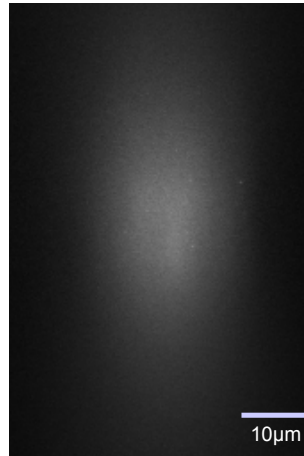


FIG. 2.11 – Fond observé pour une excitation à $\lambda = 638 \text{ nm}$. On observe ici le fond de fluorescence induit par la traversée de la lamelle couvre-objet par le laser excitateur. Ce fond a un profil gaussien à 2 dimensions, avec des largeurs à mi-hauteur différentes suivant l'axe vertical et l'axe horizontal. Cela est dû à l'angle d'incidence du faisceau laser sur l'interface. On observe un fond similaire pour une excitation à 488 nm . Puissance à l'entrée du microscope : 14 mW ; durée d'exposition : 100 ms .

provient bien de la fluorescence de la lamelle couvre-objet.

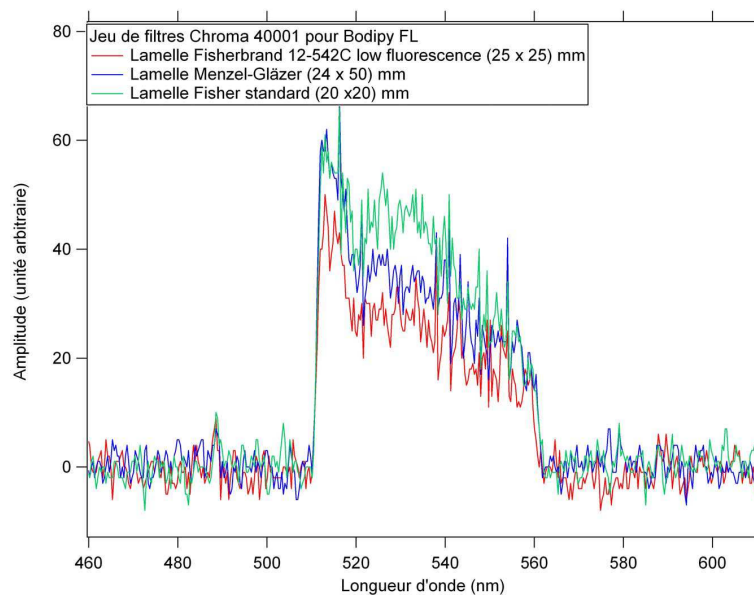


FIG. 2.12 – Spectre du fond collecté pour une excitation à $\lambda = 488 \text{ nm}$. Le filtre d'émission utilisé ici est un filtre passe-bande, le miroir dichroïque est passe-haut. Il n'y a pas de signal significatif à 488 nm .

On a essayé un autre filtre d'émission pour le Bodipy FL, cette fois passe-haut, sensé permettre de collecter plus efficacement la fluorescence du Bodipy FL. La Figure 2.13 permet de comparer les deux filtres d'émission pour le Bodipy FL (passe-bande et passe-haut). On remarque que le spectre du fond couvre une très grande plage avec le filtre passe-haut, cela avec une amplitude importante. Si on intègre l'amplitude du signal collecté par

le spectromètre, on a un nombre de coups d'environ 970 (unité arbitraire) pour le filtre passe-bande, et de 4130 (unité arbitraire) pour le filtre passe-haut. On a donc un facteur 2 en bruit de photons entre les deux types de filtre, pour un gain en signal de Bodipy FL très faible (voir Figure 3.3).

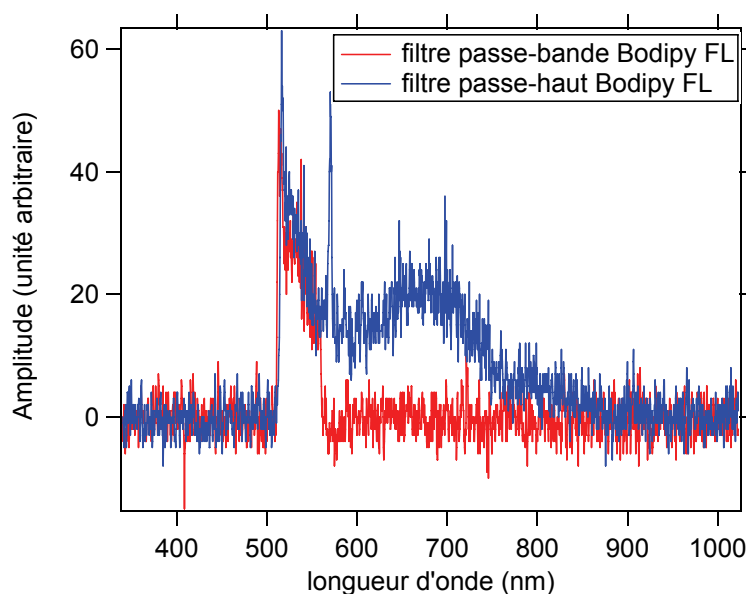


FIG. 2.13 – Comparaison du fond de fluorescence avec un filtre d'émission passe-haut et un filtre d'émission passe-bande pour le Bodipy FL. Longueur d'onde d'excitation : 488nm.

On peut faire le même constat avec l'observation du spectre de fluorescence de la lamelle couvre-objet avec une excitation à 638 nm. Avec le même échantillon que précédemment, on fait un spectre avec un filtre passe-haut (Chroma, filtre pour Cy5), on voit l'allure sur la Figure 2.14. On remarque ici que le filtre d'émission est moins bon que dans le cas d'une excitation à 488 nm, car il ne rejette pas complètement les photons à 638 nm du laser. Cela est dû au miroir dichroïque qui est centré sur 633 nm pour une excitation avec un laser He-Ne, plutôt que pour notre diode à 638 nm. On remarque aussi un pic un peu avant 750 nm, que l'on n'explique pas. Quoiqu'il en soit, ces deux pics ne forment pas la majorité des photons arrivant sur le détecteur. Si on intègre sur tout le spectre le signal collecté, on remarque que le fond provient principalement de la fluorescence du verre, allant de 660 nm (début de la partie transmise par le filtre) jusqu'à la fin du spectre (au delà de 850 nm).

L'observation du fond de fluorescence du verre pour ces deux longueurs d'ondes d'excitation (488 nm et 638 nm) nous permet de mieux choisir nos systèmes optiques (miroir dichroïque et filtre) pour optimiser notre rapport signal à bruit. On doit aussi considérer si le fond est prépondérant ou pas dans la mesure. Dans le cas de l'excitation à 488nm, il est difficile de ne pas en tenir compte, car notre marqueur fluorescent, le Bodipy FL, est peu brillant et peu photostable. Il nous faut optimiser ce rapport signal à bruit pendant le temps d'acquisition. On a donc choisi le filtre d'émission passe-bande qui, même s'il coupe la fluorescence du Bodipy FL à partir de 560 nm, nous permet de diminuer amplement le fond et permet une observation confortable en molécule unique. D'autre part, le Bodipy FL n'émet que très peu de photons au delà de 560 nm, donc la perte de signal est vraiment très faible, comparée au gain en fond.

En ce qui concerne l'excitation dans le rouge ($\lambda = 638$ nm), nous n'avons pas cherché à voir si un filtre d'émission passe-bande améliorerait le rapport signal sur bruit, car les

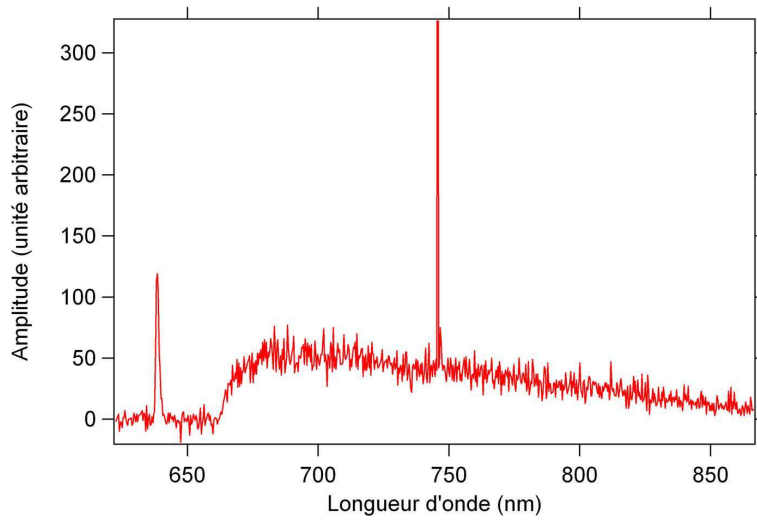


FIG. 2.14 – *Fond de fluorescence d'une lamelle couvre-objet avec une excitation à $\lambda = 638$ nm. Puissance à l'entrée du microscope : 14 mW.*

marqueurs fluorescents utilisés (QD ou Cy5) émettent un signal nettement plus fort et plus stable que le Bodipy FL.

De plus, dans un bon environnement [38, 39], on peut observer le Cy5 longtemps sans difficulté. Nous allons donc garder ce système optique dans le rouge pour l'étude du Cy5. Il est possible de réduire ce fond résiduel en utilisant des lamelles de silice fondue, qui ont beaucoup moins d'impuretés fluorescentes. Malheureusement, ces lamelles sont chères (15-20 euros pièce), fragiles, et difficilement réutilisables dans notre cas. Cet investissement n'a pas semblé pertinent dans nos expériences.

2.5 Analyse des images de fluorescence.

2.5.1 Définition du rapport Signal sur Bruit.

Nous avons besoin de connaître l'intensité d'émission de fluorescence d'un Bodipy FL unique pour une excitation donnée. L'approche en microscopie TIRF permet d'observer plusieurs dizaines voire centaines de molécules fluorescentes uniques lors d'une seule et même prise de données. Le grand avantage est qu'on peut déterminer les propriétés d'émission d'une molécule unique avec une grande statistique, en peu de prises de données. Nous voulons connaître les propriétés d'émission de notre fluorophore pendant le temps d'observation typique de notre système biologique, soit plusieurs dizaines de millisecondes. Ce système semble donc idéal dans notre cas, à condition de prendre garde à un paramètre : l'intensité locale d'excitation vue par le fluorophore. Comme l'excitation se fait par une onde évanescente dont "l'intensité"³ est directement proportionnelle à celle du laser réfléchi sur l'interface, l'intensité d'excitation aura un profil gaussien. Le bruit est l'écart quadratique moyen du fond. Pour déterminer le rapport signal sur bruit, on ne peut pas estimer le bruit en intégrant toute l'image, car celui sera sous-estimé pour une molécule située au maximum de ce profil gaussien, mais sera surestimé pour une molécule située en bordure du champ d'observation. Ici, nous allons intégrer sur une zone recevant la même

³Ce n'est pas une intensité, mais un module du champ électrique au carré, car il n'y a pas d'énergie transmise. Voir chapitre précédent.

intensité d'excitation. Le bruit local σ_{loc} a deux sources indépendantes et s'écrit :

$$\sigma_{loc} = \sqrt{\sigma_{lecture}^2 + \sigma_{fluo\ loc}^2} \quad (2.20)$$

avec σ_{loc} le fond local, $\sigma_{lecture}$ le bruit de lecture de la caméra (environ 9 niveaux de gris au minimum de l'utilisation de l'étage EM) et $\sigma_{fluo\ loc}$ le bruit de photons du fond de fluorescence local de la lamelle de verre. Il faudra donc déterminer un écart-type local du fond pour des plages d'intensité de fond. Ainsi, nous pouvons déterminer un seuil au delà du bruit pour sélectionner les molécules fluorescentes d'intérêt.

Le fond observé, provenant de la fluorescence des lamelles couvre-objets, est directement proportionnel à l'intensité locale du laser incident. Son profil est elliptique, car l'angle d'incidence du faisceau laser donne un axe plus grand que l'autre par projection. Le fond de fluorescence imagé sur la caméra est donc ajustable par une fonction gaussienne à deux dimensions. Par cet ajustement, on pourra déterminer un fond local, réaliste pour chacune des molécules de l'image, quelles que soient leurs positions. La fonction gaussienne servant à ajuster le fond de fluorescence est la suivante :

$$FitGauss2D(x, y) = I_0 + I_{max} \cdot e^{\left(-\frac{(x - x_0)^2}{x_{width}^2} - \frac{(y - y_0)^2}{y_{width}^2} \right)} \quad (2.21)$$

On peut ainsi dresser le profil en deux dimensions du fond de fluorescence, comme dans la Figure 2.15.

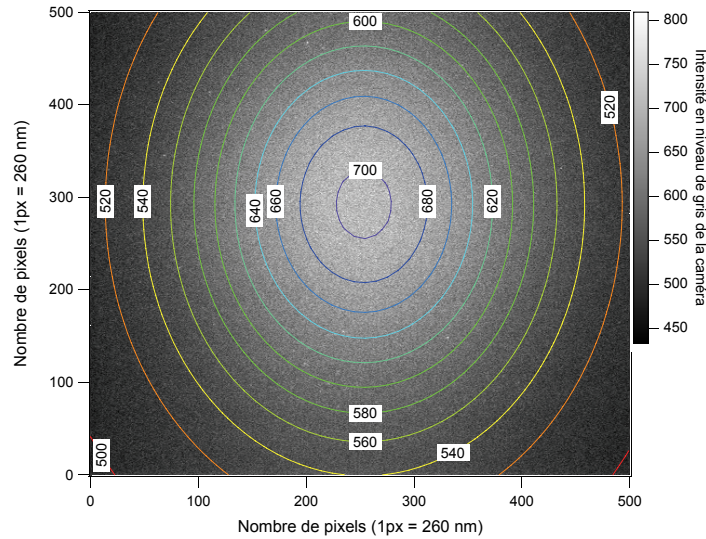


FIG. 2.15 – Image du fond de fluorescence d'une lamelle de verre couvre-objet, $P = 35\text{ mW}$ @ 488 nm , à l'entrée du microscope. L'intensité des pixels est renseignée sur la barre à droite, donnant les niveaux de gris. L'image est ajustée avec une gaussienne à 2 dimensions. Les courbes donnent les courbes de niveau de l'ajustement gaussien (avec leurs valeurs en encadré). Les paramètres de l'ajustement sont : $I_0 = 492,99 \pm 0,19$ niv. de gris ; $I_{max} = (212,09 \pm 0,18)$ niv. de gris ; $x_0 = (253,31 \pm 0,07)$ pixels ; $x_{width} = (117,98 \pm 0,16)$ pixels ; $y_0 = (292,1 \pm 0,1)$ pixels ; $y_{width} = (168,94 \pm 0,23)$ pixels.

A partir de ce fond, on peut calibrer le bruit par tranche d'intensité du fond (Figure 2.16). Pour avoir une mesure de l'écart-type du fond, on définit la position (x_0, y_0)

du maximum I_{max} dans la fonction de l'ajustement, et autour de ce point, nous découpons l'image en 10 couronnes elliptiques correspondant chacune à une intensité du fond comprise entre n et $(n+1)$ fois $I_{max}/10$ (n allant de 0 à 9). Sur chaque tranche, nous déterminons un écart-type "local" du fond, comme défini par la formule suivante :

$$\sigma_{loc} = \frac{\sqrt{\sum_{px} (I_{px}^2 - I_{moy}^2)}}{N_{px}} \quad (2.22)$$

σ_{loc} définit l'écart-type local du bruit, I_{px} l'intensité du pixel sondé, I_{moy} la moyenne de tous les pixels de la tranche étudiée, et N_{px} le nombre de pixels de la tranche évaluée.

Les molécules fluorescentes se verront alors attribuer une valeur de bruit correspondant à leurs positions sur le profil gaussien à deux dimensions. Nous pouvons ainsi déterminer une valeur du bruit autour d'une molécule très proche de la valeur réelle.

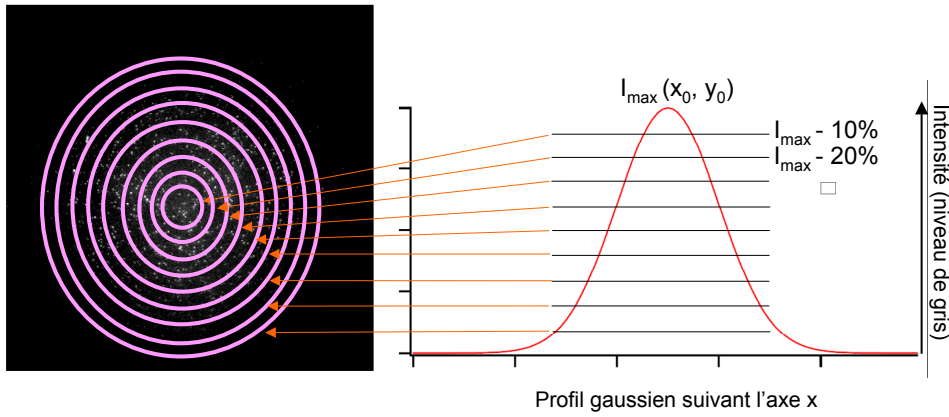


FIG. 2.16 – Gauche : image de Bodipy FL en TIRFM. Schéma des courbes de niveau représentant les tranches de 10% de I_{max} , partant du maximum en (x_0, y_0) . Droite : représentation du profil gaussien du fond suivant l'axe x . Chaque trait représente la limite de l'incrément de 10%, à partir de la valeur maximale de l'ajustement, I_{max} .

Cette étape est nécessaire pour évaluer proprement le rapport signal sur bruit de chaque molécule, afin de ne sélectionner que celles qui sont au delà d'un certain seuil. Nous fixons ce seuil à un nombre de fois le bruit local où la molécule se situe (typiquement, signal/bruit = 3). Si nous avions pris un écart-type global du fond sur toute l'image, nous aurions éliminé des molécules sur les bords de la zone d'excitation, car le seuil aurait été surévalué au profit de molécules au centre où le bruit est sous-évalué.

2.5.2 Extension spatiale des signaux de fluorescence.

Ici, nous travaillons avec des molécules fluorescentes, dont la taille n'excède pas quelques nanomètres. Donc, elles sont beaucoup plus petites que la limite de diffraction du microscope. Ainsi, les signaux de fluorescence détectés par la caméra CCD doivent avoir une taille limitée par la diffraction, répondant à la loi d'Airy :

$$D = 1,22 \cdot \frac{\lambda}{\text{O.N.}} \quad (2.23)$$

où D est le diamètre de la tache d’Airy, λ est la longueur d’onde d’émission de la molécule fluorescente et O.N. l’ouverture numérique de l’objectif de microscope. D’après cette formule, nous devons avoir des taches de fluorescence ayant un diamètre de 430 nm environ pour des Bodipy FL uniques bien séparés avec notre objectif de microscope (émission maximale à $\lambda = 511$ nm, filtre d’émission transmettant à partir de $\lambda = 510$ nm). Comme les pixels sur notre image mesurent 260 nm lorsqu’on les groupe 2×2 , une molécule fluorescente s’étend sur environ 4 pixels (Figure 2.17) dans le plan focal objet de la lentille tube. Nous sommes contraints de réduire le nombre de pixels sur lesquels sont imagés les fluorophores, car le Bodipy FL n’émet pas assez de photons pour avoir un signal sur bruit suffisant pour être visible en molécule unique sur 16 pixels.

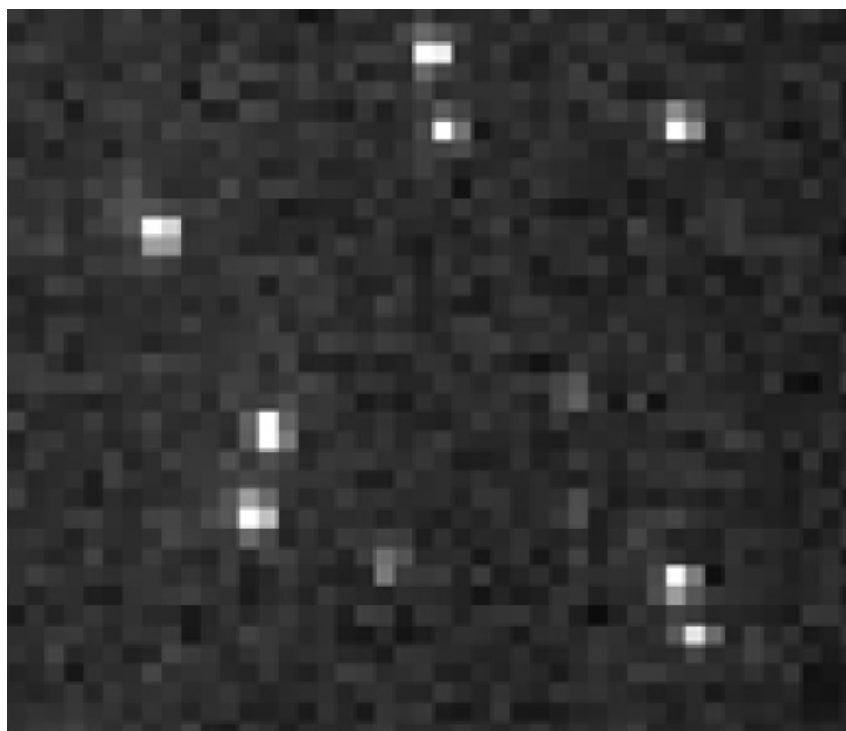


FIG. 2.17 – Image de Bodipy FL en molécule unique zoomée fortement. Ceux-ci sont bien discernables et les tailles des taches de fluorescence sont bien limitées par diffraction. Un pixel correspond à 260 nm de côté dans le plan objet. Excitation à 488 nm, Intensité moyenne incidente = 500 W/cm². Temps d’acquisition 100 ms.

Nous allons donc présélectionner uniquement les molécules fluorescentes ayant un signal sur bruit suffisant et donc l’extension est limitée par diffraction. Cependant, ces deux critères ne sont pas suffisants pour être sûr qu’on observe une molécule unique. Il peut en particulier s’agir de deux molécules non résolues spatialement par le microscope.

2.5.3 Photoblanchiment en une étape.

Il est bien connu que les molécules organiques fluorescentes ont une durée de vie limitée, fortement dépendante des conditions environnantes. En effet, à partir d’une certaine durée d’excitation, la molécule subit une photo-oxydation en général et ne fluoresce plus. C’est le photoblanchiment. Cette dégradation est irréversible et s’effectue en une étape (Figure 2.18). La durée de vie avant photoblanchiment a en première approximation un profil en exponentielle décroissante pour un ensemble de molécules uniques, qui nous permettra de déterminer une durée de vie moyenne de ce fluorophore. Ce graphique (Figure

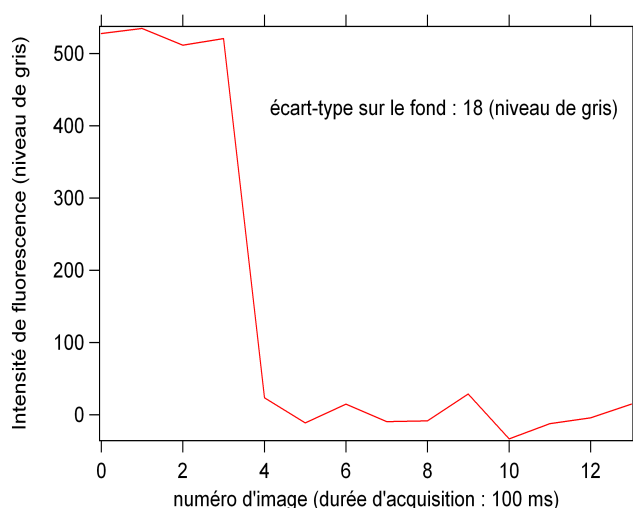


FIG. 2.18 – *Evolution de la fluorescence d'un Bodipy FL unique. Intensité moyenne incidente @ 488 nm = 500 W/cm². Durée d'exposition : 100 ms/image du film. On a un rapport signal sur bruit d'environ 28. Tampon TRIS 100 mM avec 250 mM de NaCl, pH = 7,5.*

2.18) présente l'évolution de l'intensité de fluorescence d'un fluorophore dans un film de 14 images, avec une durée d'acquisition par image de 100 ms. Il est typique d'une molécule unique, ayant un photoblanchiment, c'est-à-dire une perte totale de fluorescence, en une étape. Nous avons écrit un programme d'analyse des signaux de fluorescence qui sélectionne les molécules ayant un photoblanchiment en une étape, soit d'une image sur l'autre. On ajuste l'évolution temporelle du signal de fluorescence par une fonction marche d'escalier. On n'autorise pas de fluctuations supérieures au bruit du fond sur le plateau "bas" de cette fonction (après photoblanchiment). Les fluctuations du plateau "haut" (signal de fluorescence avant photoblanchiment) sont autorisées dans une limite de 40% de la moyenne du plateau haut. Ce critère pris empiriquement convient bien. Nous devrions être limités par le bruit de photons de l'intensité de fluorescence, mais certains phénomènes photophysiques, détaillés dans un autre paragraphe, entraînent des fluctuations importantes du plateau haut (clignotement rapide, à la durée de vie inférieure à la durée d'acquisition).

2.6 Conclusion.

Dans ce chapitre, nous avons présenté la méthode de microscopie TIRF. Celle-ci est bien adaptée à l'étude du ribosome en molécule unique, car elle permet d'observer de nombreux systèmes uniques en une seule prise de donnée, cela avec un bon rapport signal sur bruit. Nous avons caractérisé l'onde évanescence suivant l'orientation de la polarisation du laser d'excitation, pour caractériser au mieux l'excitation des fluorophores. A partir de ce travail, nous pouvons observer des molécules uniques. Pour analyser leurs signaux de fluorescence, nous avons caractérisé le rapport signal sur bruit de chaque molécule, cela en déterminant le bruit de fond local. Cela nous permettra de discriminer les fluorophores. Ensuite, nous avons développé une série de critères pour discriminer les fluorophores uniques d'autres objets fluorescents. Nous pouvons maintenant passer à l'étude de fluorophores organiques, et plus particulièrement le Bodipy FL, que nous utilisons dans notre étude biologique.

Chapitre 3

Photophysique du Bodipy FL en molécule unique.

Dans ce chapitre, nous souhaitons caractériser les propriétés photophysiques du Bodipy FL ¹ en molécule unique. A partir de là, nous devons définir une méthode pour évaluer le nombre d'acides aminés fluorescents incorporés dans la protéine, en les comptant soit a posteriori, soit en temps réel. Pour cela, nous nous sommes efforcés de caractériser le taux de fluorescence d'un Bodipy-FL en fonction de l'intensité d'excitation et sa durée de vie. Les premiers résultats obtenus nous ont amenés à rechercher un milieu plus approprié que le tampon que nous utilisions pour améliorer les propriétés photophysiques du Bodipy-FL.

Nous nous sommes inspirés de travaux sur un marqueur classique, le Cy5, dont les propriétés photophysiques et notamment la statistique d'émission sont bien documentées [38, 39, 40, 41, 42].

3.1 Présentation de l'étude biologique et rôle du Bodipy FL dans cette étude.

Nous souhaitons observer la dynamique de traduction des protéines par le ribosome. Autrement dit, nous souhaitons connaître la vitesse d'incorporation des acides aminés par le ribosome lors de la synthèse d'une protéine à l'échelle d'observation de la molécule unique. Nous disposons d'un acide aminé, la lysine, marqué avec un fluorophore, le Bodipy FL (Figure 3.1).

Ce système est commercial (FluoroTect. GreenLys in vitro Translation Labeling System, Promega) et est vendu pour observer la traduction en mesure d'ensemble, afin de remplacer les études en radioactivité. Dans ces dernières, on utilise un acide aminé spécifique radioactif, comme la méthionine S³⁵. Ces expériences nécessitent une zone de travail dédiée dans laquelle des conditions de sécurité drastiques doivent être respectées, et sont donc lourdes en infrastructure. Le système basé sur les lysines marquées permet de se passer de ces conditions de sécurité car l'observation de la traduction se fait par une mesure de fluorescence du Bodipy FL. L'intérêt de ce système pour les mesures d'ensemble n'est plus à démontrer. Il permet d'avoir un bon rapport signal à bruit, et n'a pas d'influence sur l'efficacité de la traduction en mesure d'ensemble. Ce système est tout indiqué pour l'observation en molécule unique de l'activité des ribosomes, car il fournit déjà un marqueur fluorescent fixé spécifiquement aux acides aminés lysines avant la traduction. Le Bodipy FL est utilisé dans ce cas-là car c'est un marqueur de petite taille. Il est capable d'entrer dans le tunnel des acides aminés du ribosome sans bloquer la traduction. Il au-

¹(acide 4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-propionique)

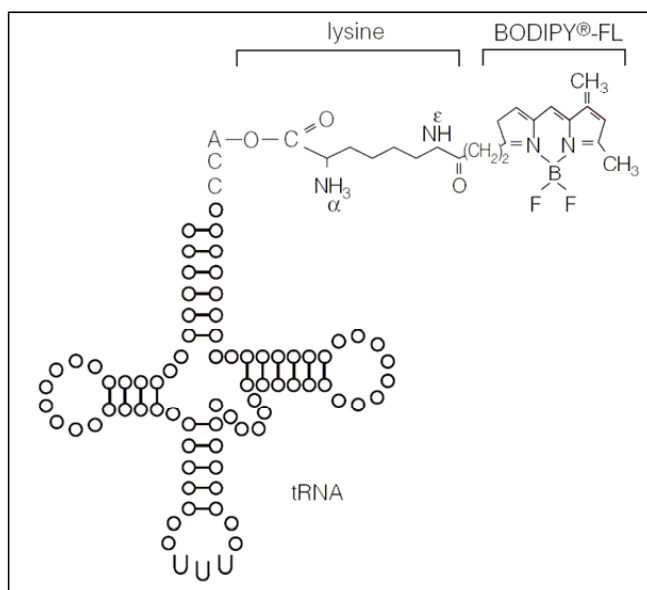


FIG. 3.1 – Schéma de l'ARN de transfert chargé avec son acide aminé lysine, sur lequel est greffé un Bodipy FL. Image Promega.

torise donc l'observation de plusieurs cycles d'élongation complets.

Son utilisation en molécule unique permettrait de déterminer une vitesse de traduction des ribosomes dans des conditions données. Pour cela, nous souhaitons compter le nombre de lysines incorporées par le ribosome en comptant les Bodipy FL détectés en microscopie de fluorescence, comme on peut le représenter sur la Figure 3.2. Dans cette expérience, nous observons l'échantillon après la traduction de l'ARNm en protéine. Si on veut connaître le nombre de lysines marquées, il nous faut déterminer l'intensité de fluorescence d'un Bodipy FL pour compter exactement le nombre de Bodipy FL sur chaque polypeptide. On peut aussi observer les Bodipy FL photoblanchir successivement lors de l'acquisition des données, et compter le nombre de "marches" sur un graphique représentant l'intensité de fluorescence en un point de l'image en fonction du temps.

3.2 Propriétés photophysiques du Bodipy FL : état des connaissances.

Très peu d'études ont été réalisées sur le Bodipy FL en molécule unique, bien qu'il soit couramment utilisé par les biologistes pour des mesures d'ensemble. Ce fluorophore a son spectre d'absorption dans le bleu (maximum : 502 nm). On choisit de l'exciter à 488 nm. On collecte la fluorescence dans le vert (pic d'émission à 515 nm environ), comme on peut le voir sur les spectres d'absorption et d'émission de la Figure 3.3.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données concernant l'intensité de saturation ou la statistique d'émission du Bodipy FL, points essentiels de notre expérience. Etant peu brillant, et se dégradant rapidement dans un milieu contenant de l'oxygène, il est peu utilisé comme traceur dans des expériences de molécules uniques. De plus, il émet dans le vert (≈ 515 nm), donc dans une zone du spectre où il y a beaucoup de fluorescence endogène. Malgré ces inconvénients, sa petite taille en fait un candidat idéal pour l'étude de la dynamique du ribosome car il perturbe peu les systèmes biologiques. Une étude ap-

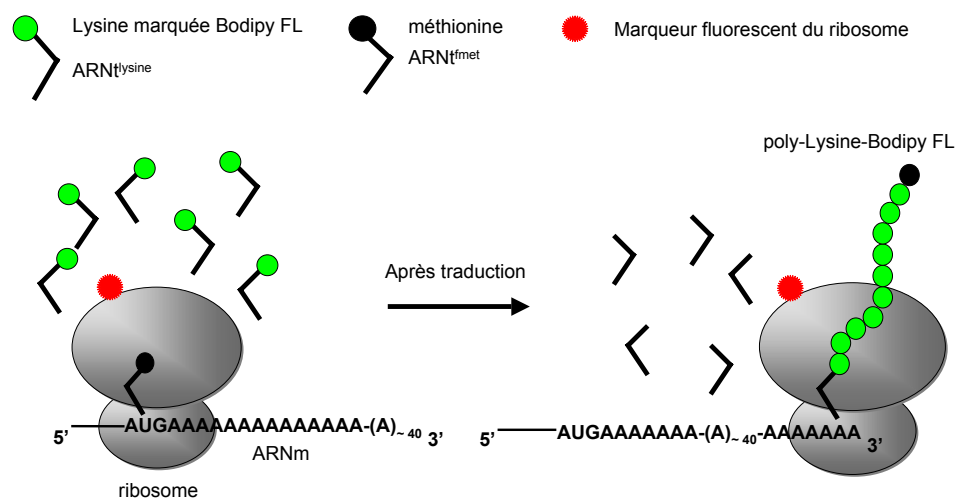


FIG. 3.2 – Schéma de l'expérience d'incorporation d'acides aminés lysines marqués Bodipy FL par le ribosome lors de la traduction d'un ARNm poly-A. Le ribosome est lui-même marqué à l'aide d'un marqueur fluorescent, pour pouvoir le localiser. On a représenté le codon initiateur, AUG, qui code pour l'acide aminé méthionine. L'ARNm que nous utilisons comporte une quarantaine d'adénines, ce qui code pour environ 13-15 lysines.

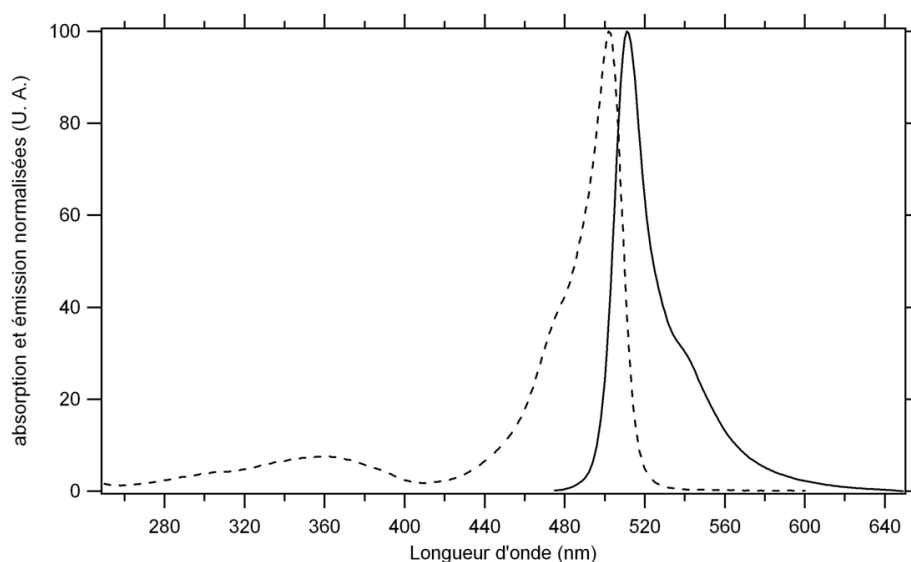


FIG. 3.3 – Spectre d'absorption (en pointillé) et d'émission (trait plein) du Bodipy FL dans du méthanol.

profondie de ses propriétés d'émission et une augmentation significative de sa durée de vie pourraient bénéficier à d'autres études de systèmes biologiques en molécule unique. Les contraintes techniques et biologiques auxquelles nous sommes confrontés nous obligent à mieux comprendre et à améliorer les propriétés photophysiques du Bodipy FL.

3.3 Photophysique individuelle du Bodipy FL dans un milieu contenant de l'oxygène.

Maintenant que nous sommes capables d'observer et de sélectionner toutes les molécules d'intérêt, nous pouvons les analyser afin de déterminer une durée de vie et une intensité de saturation. Pour ce faire, nous avons besoin de savoir pour quelle intensité ces marqueurs atteignent la saturation. Nous pouvons le déterminer à l'aide du fond de fluorescence.

3.3.1 Mesure de l'intensité de saturation d'un fluorophore à l'aide du fond de fluorescence de la lamelle couvre-objet.

L'intensité de saturation est l'intensité d'excitation avec laquelle on atteint le taux maximum d'émission d'un fluorophore. On veut donc tracer l'évolution de l'émission d'un fluorophore en fonction de l'éclairement. Ainsi, pour mesurer l'intensité de saturation d'un fluorophore, il nous faut savoir quel éclairement il reçoit. Comme nous l'avons montré précédemment, dans le cas de la microscopie TIRF, l'intensité sur l'ensemble de la zone d'observation n'est pas uniforme, mais a un profil gaussien. Donc, l'éclairement vu par une molécule au sommet de cette gaussienne n'est pas le même que pour une molécule sur une aile de cette gaussienne (Figure 3.4). Il nous faut donc calibrer l'intensité locale d'excitation. Pour cela, nous allons utiliser le fond de fluorescence, dont on connaît l'intensité sur l'image en niveaux de gris.

Intensité du fond de fluorescence proportionnelle à l'intensité d'excitation.

On va calibrer l'évolution de l'intensité maximale I_{max} de l'ajustement gaussien du fond en fonction de la puissance du laser à l'entrée du microscope. Cela va nous permettre de caractériser en chaque point de l'image l'intensité d'excitation en fonction de la puissance du laser à l'entrée du microscope.

La Figure 3.5 montre que l'amplitude de l'ajustement gaussien du fond de fluorescence de la lamelle n'évolue pas au cours du temps, entre la première et la dernière image. De plus, elle évolue linéairement avec la puissance du laser à l'entrée du microscope.

A partir de cette courbe expérimentale, nous déterminons l'intensité locale sur chaque pixel en analysant la valeur du fond en niveaux de gris. Nous avons une intensité de l'onde incidente de $2,5 \text{ W/cm}^2$ /niveau de gris pour une durée d'exposition de 100 ms. Pour avoir l'"intensité" de l'onde évanescente pour chacune des molécules, il faut aussi multiplier par le coefficient de Fresnel en transmission, qui varie suivant une polarisation TM ou TE. Dans la suite de cet exposé, nous nous placerons à un angle d'incidence de 67° (estimation), ce qui donne un coefficient de transmission de 2,7 en TM, et 2,3 en TE. Cela nous permet de revenir à l'intensité vue par les fluorophores.

Intensité de saturation d'un marqueur fluorescent.

Pour déterminer l'intensité de saturation d'un marqueur fluorescent, nous allons étudier l'évolution de la fluorescence de molécules uniques à partir d'un film. Dans celui-ci, le fluorophore est excité pendant la prise d'image. Ce film dure bien au delà de la durée de

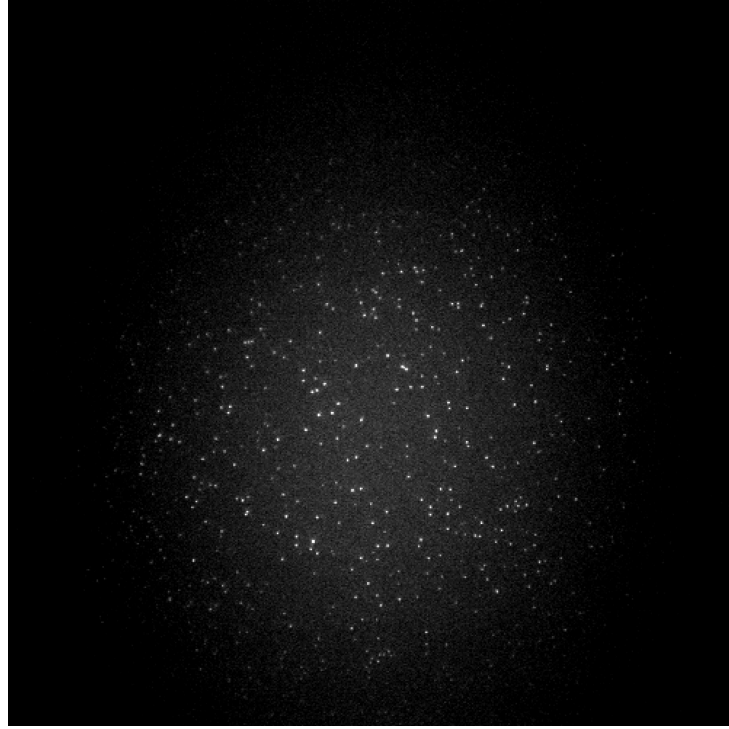


FIG. 3.4 – Image de Bodipy FL en TIRFM. Intensité moyenne incidente = 400 W/cm^2 @ 488 nm . Temps d'exposition : 100 ms . L'image fait 130 microns de côté. On remarque que les Bodipy FL situés au centre du faisceau d'excitation (fond le plus important) sont plus brillants que ceux situés à la périphérie (fond moins important).

vie des molécules étudiées, de 14 images de 100 ms chacune. Nous préparons un échantillon contenant des oligonucléotides marqués Bodipy FL. La surface est du type BSA-biotine-streptavidine. Nous remplissons la cellule avec du tampon TRIS (100 mM) salé (NaCl 250 mM). Après sélection des fluorophores par les différents critères cités ci-dessus, nous déterminons l'intensité de fluorescence de tous les marqueurs de la zone observée sur la première image. Nous mesurons ensuite l'intensité du fond sur la dernière image, là où se situait chacune de ces molécules. Nous avons bien entendu vérifié que le fond ne changeait pas au cours du temps sous l'effet du laser d'excitation, à intensité constante. Nous représentons ensuite l'intensité de fluorescence pour chaque molécule en fonction de la valeur du fond à leurs positions respectives (Fig 3.6).

Pour déterminer le nombre de photons détectés sur la caméra, nous avons pris en compte le facteur de conversion de la caméra ($4,4$ électrons par coups), le gain EM utilisé (6 au minimum), l'efficacité quantique de la caméra η à la longueur d'onde d'émission du Bodipy FL (environ 55% à 520 nm) :

$$N_{\text{photons}} = \frac{(I_{\text{totale}} - I_{\text{lecture}}) \cdot \text{Facteur de conversion}}{\text{gain EM} \cdot \eta} \quad (3.1)$$

Nous allons dans un premier temps modéliser le Bodipy FL par un système à 2 niveaux, avec un état fondamental (S_0) et un état excité (S_1). La durée de vie de l'état excité S_1 est de l'ordre de la nanoseconde. La durée du passage de l'état excité vers l'état fondamental est de l'ordre de la picoseconde [43]. Ce système a deux moyens pour descendre de l'état excité vers l'état fondamental : soit radiativement (probabilité k_r), soit non radiativement (probabilité k_{nr}). Considérons k_{01} le taux de transition de l'état fondamental vers l'état excité, k_{10} le taux de transition pour aller de l'état excité vers l'état

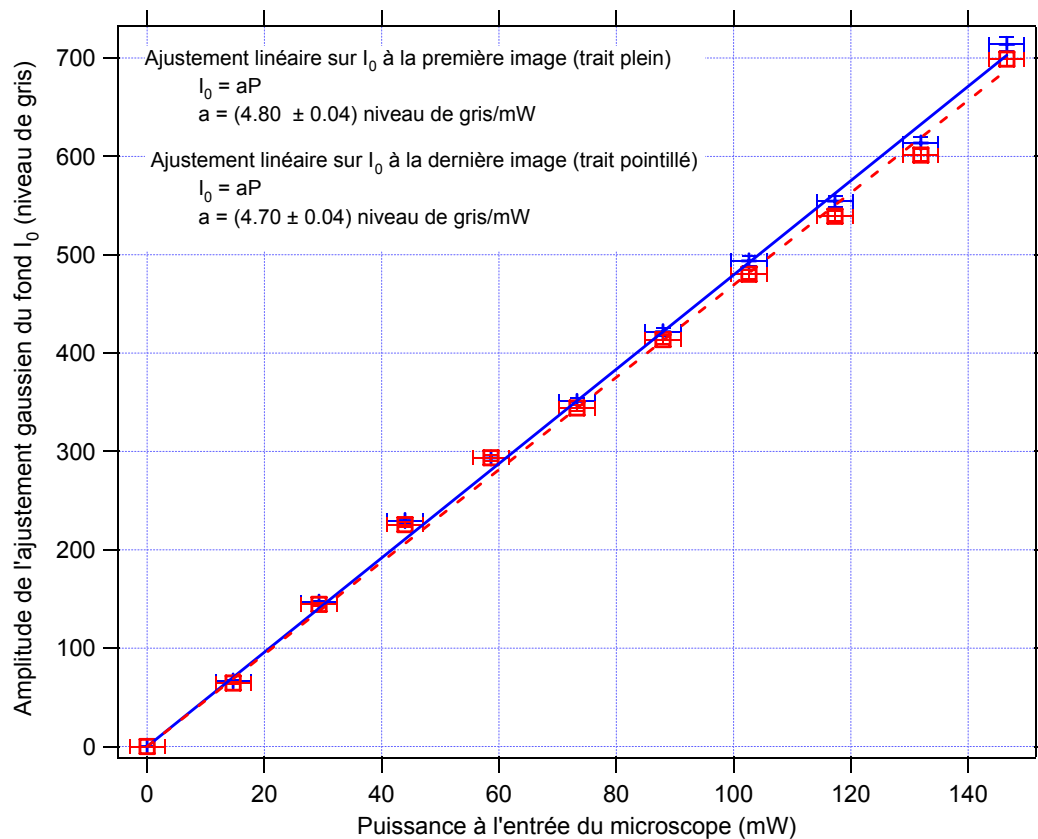


FIG. 3.5 – Evolution de l'amplitude de l'ajustement gaussien du fond de fluorescence de la lamelle de verre en fonction de la puissance laser à l'entrée du microscope. Analyse faite à partir de films de 14 images, avec un temps d'acquisition de 100 ms par image. Les croix bleues correspondent aux valeurs prises sur les premières images de chaque film (ajustement en trait plein bleu). Les carrés rouges correspondent aux valeurs prises sur les dernières images (ajustement en trait pointillé rouge).

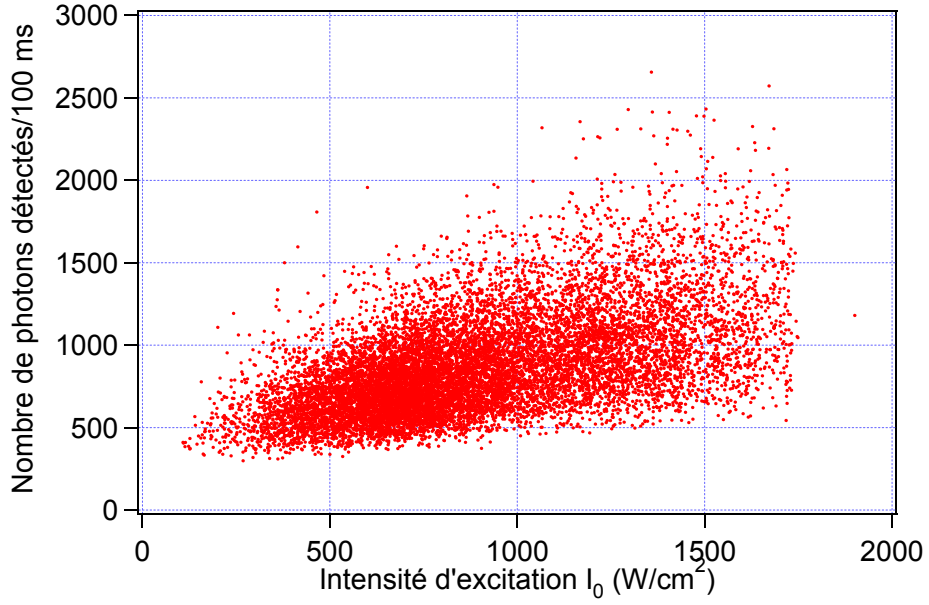


FIG. 3.6 – *Intensité de fluorescence de Bodipy FL en fonction de l'amplitude du fond à leurs emplacements. Excitation à 488 nm en polarisation TE, durée d'exposition : 100 ms. L'intensité de fluorescence est mesurée sur la première image, l'amplitude du fond sur la dernière image, sur des films de 14 images. On a réalisé plusieurs films pour avoir cette statistique.*

fondamental, tels que :

$$k_{10} = k_{nr} + k_r \text{ et } k_{01} = \frac{\sigma \lambda}{hc} \cdot I_{exc} \quad (3.2)$$

avec σ la section efficace d'absorption de la molécule (en cm^2), λ la longueur d'onde d'excitation, h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière et I_{exc} l'intensité du faisceau laser d'excitation en W/cm^2 . On peut représenter ce système avec le diagramme de la Figure 3.7.

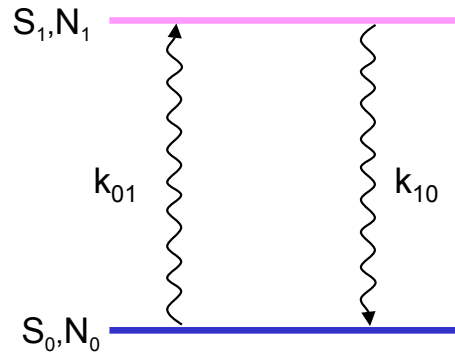


FIG. 3.7 – *Diagramme d'un système à deux niveaux. S_0 est l'état fondamental, N_0 sa population. S_1 est l'état excité, N_1 sa population.*

On considère que la population totale N de ce système est conservée, soit $N_0 + N_1 = N$. On peut normaliser cette population en notant $n_0 + n_1 = 1$ avec $N_0/N = n_0$ et $N_1/N = n_1$.

On pose l'équation de population de l'état excité :

$$\frac{d n_1}{dt} = k_{01}n_0 - k_{10}n_1 \quad (3.3)$$

avec $k_{01} = \frac{\lambda\sigma}{hc}I_{exc}$.

La solution à l'état stationnaire nous donne :

$$n_1 = \frac{I_{exc}/I_{sat}}{1 + I_{exc}/I_{sat}} \quad (3.4)$$

en introduisant l'intensité de saturation I_{sat} :

$$I_{sat} = k_{10} \frac{hc}{\lambda\sigma} \quad (3.5)$$

Le taux de fluorescence Γ est :

$$\Gamma = k_r n_1 = k_r \frac{I_{exc}/I_{sat}}{1 + I_{exc}/I_{sat}} \quad (3.6)$$

A partir de l'équation du taux de fluorescence à l'état stationnaire, nous pouvons faire un ajustement du graphique représentant l'intensité de fluorescence des Bodipy FL en fonction du niveau de gris des pixels où ils sont localisés qui est proportionnel à l'intensité d'excitation (Figure 3.8). La fonction utilisée pour l'ajustement est du type :

$$N_{fluo} = \frac{N_{max}}{1 + \frac{I_{sat}}{I_0}} \quad (3.7)$$

avec N_{fluo} le nombre de photons de fluorescence émis par les Bodipy FL collectés sur la caméra pendant la durée d'acquisition, N_{max} le nombre de photons maximal émis par les Bodipy FL pour la durée d'acquisition, I_{sat} l'intensité d'excitation en niveaux de gris donnant un nombre de photons émis correspondant à $N_{max}/2$ pour la durée d'acquisition, et I_0 l'intensité locale du fond de fluorescence (proportionnelle à l'intensité locale du faisceau laser d'excitation) sur l'échantillon en niveaux de gris.

On peut revenir à la puissance à l'entrée du microscope nécessaire pour atteindre la saturation avec la courbe présentant l'évolution de l'amplitude du fond de fluorescence de la lamelle couvre-objet (Figure 3.5). Evidemment, si on se place juste à cette puissance, on ne trouvera de fluorophore à saturation que sur le sommet de la gaussienne (zone la plus intense). Dans la pratique, nous nous plaçons légèrement au delà. Par exemple, l'intensité de saturation pour le Bodipy FL est atteinte à 134 niveaux de gris dans le TRIS à 100 ms de durée d'exposition. Cela représente une intensité de saturation de 340 W/cm² environ, en prenant en compte le coefficient de Fresnel en TE, nous avons 780 W/cm².

On remarque que les points sont distribués avec une importante dispersion autour de l'ajustement. La dispersion observée rend problématique la précision avec laquelle nous sommes capables de compter les acides aminés incorporés par le ribosome. Il est donc important de caractériser les différentes sources de dispersion et de les limiter, pour avoir une dispersion limitée par le bruit de photon, ou du moins la plus proche possible de cette limite.

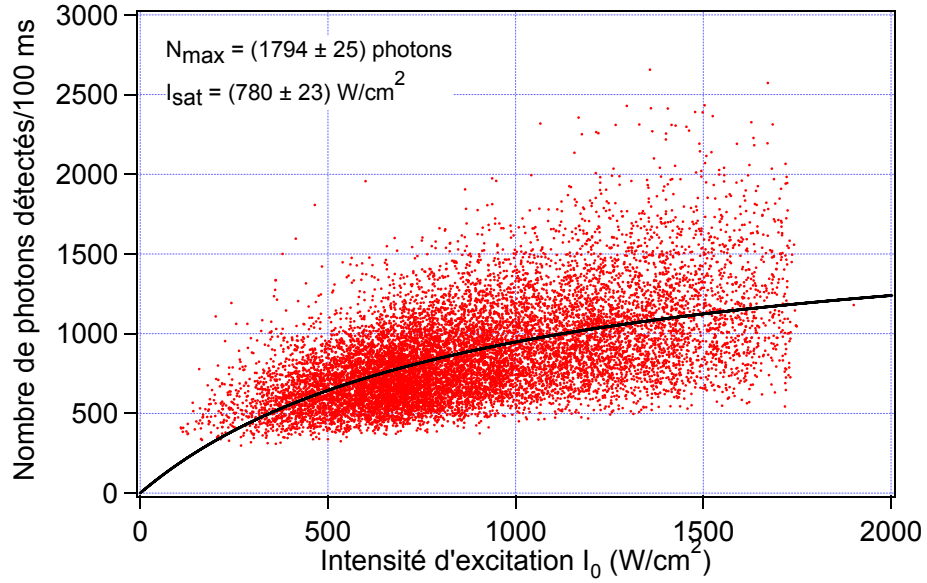


FIG. 3.8 – Mêmes données que dans le graphique 3.6, avec l'ajustement pour un modèle à deux niveaux. $I_{\text{sat}} = 132$ niveaux de gris de la caméra. Le plateau d'intensité de fluorescence se situe à $N_{\max} = 1794$ photons.

3.3.2 Dispersion de l'intensité de fluorescence du Bodipy FL. Problème de clignotement.

Plusieurs phénomènes peuvent être responsables de la dispersion observée sur la courbe de la Figure 3.8.

On peut évoquer l'orientation des fluorophores à la surface. Ces molécules sont disposées aléatoirement à la surface. On les considère comme des dipôles électriques, donc par nature leur émission n'est pas isotrope. Cela joue sur la quantité de photons collectés par l'objectif, car ils ne seront pas tous émis vers celui-ci.

L'environnement des Bodipy FL peut aussi jouer, notamment le milieu biologique (ADN, tampon...). La mise au point a aussi une influence, car comme on prend plusieurs films sur des zones différentes de l'échantillon, la mise au point n'est pas rigoureusement la même à chaque fois. D'autre part, de nombreuses études décrivent le clignotement des fluorophores organiques.

Celui-ci se manifeste de deux façons : un clignotement long, de l'ordre de la centaine de millisecondes, voire la seconde, et un clignotement court, de l'ordre de la milliseconde. Ce second type de clignotement peut intervenir dans la dispersion du signal. Enfin, on doit aussi tenir compte de la durée de vie avant photoblanchiment du fluorophore. En effet, la durée de vie d'un fluorophore organique suit une loi exponentielle décroissante. Si la durée de vie est courte devant la durée d'acquisition, beaucoup de fluorophores auront blanchi pendant la première image, cela à des temps différents, et auront donc, à taux de fluorescence égal, émis chacun un nombre différent de photons durant l'acquisition de cette première image.

Nous allons présenter ces différents cas, et voir s'ils sont prépondérants dans notre étude.

Influence de la disposition des fluorophores à la surface sur la collection des photons.

On peut assimiler un fluorophore à un dipôle électrique excité par une onde électromagnétique comme nous l'avons présenté précédemment. Considérons ces fluorophores fixés à la surface. Dans ce cas, une onde de polarisation parallèle à l'axe des dipôles excitera leur fluorescence de façon optimale, et leurs émissions maximales seront perpendiculaires à cet axe. Cela est vrai pour le cas où ces dipôles sont figés et orientés à la surface. Nous avons montré que l'efficacité de collection des photons change suivant l'orientation du dipôle par rapport à l'interface. Cette variation (sans prendre en compte l'efficacité d'excitation) est de 10% entre l'orientation idéale et la moins bonne. Or, on observe des fluctuations beaucoup plus importantes sur la courbe de saturation, de l'ordre de 50% autour de la valeur moyenne. Donc l'orientation ne peut expliquer à elle seule la dispersion des données. Dans notre cas, les fluorophores sont attachés à la surface via un monobrin d'ADN (oligonucléotide). Donc, ils n'ont aucune raison d'avoir une orientation privilégiée à la surface. En effet, la liaison chimique entre l'oligonucléotide et le fluorophore est une simple liaison carbone-carbone, et est donc libre en rotation. L'orientation des dipôles évolue librement. Il a déjà été montré pour d'autres fluorophores que ces rotations n'influent pas sur le signal [44], car elles sont bien plus rapides que le temps d'acquisition d'une image, et sont donc moyennées pendant l'acquisition. Elles ont peu d'influence sur les fluctuations observées sur l'émission de fluorescence. Cet argument n'explique pas les importantes variations de signal observées.

Influence de l'environnement sur la fluorescence des Bodipy FL.

L'environnement proche, comme le monobrin d'ADN auquel le Bodipy FL est attaché, ou la BSA et/ou la streptavidine, ou encore le tampon peuvent influencer son émission. En ce qui concerne le monobrin d'ADN, des études ont montré que la présence d'une guanine (nucléotide) à proximité du Bodipy FL peut absorber l'énergie d'excitation de la molécule ("quencher"), et donc diminuer grandement la fluorescence de celui-ci [45]. Cela a déjà été observé pour des constructions particulières d'oligonucléotides avec le Bodipy FL [46]. On y remarque que la distance entre le Bodipy FL et la guanine va jouer dans l'efficacité d'absorption de l'énergie d'excitation. Cette efficacité sera de 95% pour une distance de 6 liaisons carbone-carbone plus 5 adenines, et de 92% pour une distance de 9 liaisons carbone-carbone plus 5 adenines. Dans notre cas, la première guanine est 5 nucléotides après la liaison du Bodipy FL à l'oligonucléotide (Séquence : Bodipy FL-5'-CAT TCG CCA TTC AGG CTG AAC-3'-biotine), donc ce problème, s'il existe, est mineur. De plus, tous les oligonucléotides ont la même séquence, donc cela n'ajoute a priori rien à la dispersion.

Influence de la mise au point de l'objectif.

Pour réaliser la courbe de saturation nous avons eu besoin d'avoir une statistique de plusieurs centaines, voire milliers de points. Evidemment cette statistique n'a pu être obtenue à partir d'un seul film. Il nous a fallu en faire plusieurs, à différents endroits de l'échantillon. Or, la mise au point est effectuée à l'aide de la molette du microscope à $\pm 0,5 \mu\text{m}$ (molette de mise au point de l'objectif de microscope graduée à $1 \mu\text{m}$). Or, avec notre objectif de microscope, avec une O.N. de 1,45, on a une profondeur de champ de $\lambda/\text{O.N.}^2$, soit 250 nm environ pour une émission à 510 nm (typique du Bodipy FL). Vu la précision que nous pouvons avoir sur notre mise au point, nous avons avec certitude des variations importantes à l'échelle de la profondeur de champ, sans que cela ne se remarque trop lors de la prise de données. On peut donc avoir des variations de l'ordre de la centaine de nanomètres sur la mise au point. Elles entraînent un étalement de la tâche d'Airy sur

plus de 4 pixels. Comme nous moyennons l'intensité des pixels au delà du seuil (trois fois le bruit de fond local) pour chaque Bodipy FL, nous ne détectons pas l'étalement de la tâche de diffraction sur plus de 4 pixels, dû au défaut de mise au point. On a quantifié cette erreur qui est de l'ordre de 10% de variation d'intensité de fluorescence, pour une variation de mise au point de $1\text{ }\mu\text{m}$ autour du plan focal. Ce n'est pas suffisant pour expliquer la dispersion de nos données.

Influence de la durée d'acquisition des images.

Si on considère que le fluorophore étudié a une durée de vie plus courte ou équivalente à la durée d'acquisition des images, presque tous les fluorophores auront photoblanchi à la fin de l'acquisition de la première image. Statistiquement, tous les marqueurs ne vont pas s'arrêter d'émettre en même temps pendant l'acquisition de l'image, et n'auront donc pas émis la même quantité de photons au moment de disparaître, à excitation équivalente. Le cas du Bodipy FL correspond à cette description. C'est le principal argument pour expliquer la dispersion.

Influence du clignotement court sur la dispersion de l'intensité de fluorescence du Bodipy FL.

Un autre argument sur la dispersion est le clignotement aux temps courts. Celui-ci intervient a priori à l'échelle de la milliseconde, nous ne pouvons l'observer durant notre acquisition, car notre résolution temporelle est trop faible (10 ms au plus bas). On peut voir un exemple des différents types de clignotement dans la Figure 3.9. Ce sont les fluctuations importantes du plateau haut, avec un temps d'acquisition court (10 ms), qui nous suggèrent ce clignotement. Le clignotement aux temps longs, de l'ordre de la centaine de millisecondes, ne joue pas de rôle dans la dispersion, par contre il est gênant pour l'étude de l'incorporation des acides aminés marqués avec un Bodipy FL, car on ne veut pas confondre un deuxième pic de fluorescence, correspondant à une ré-émission après une extinction longue, avec l'incorporation d'un nouvel acide aminé et donc d'un nouveau Bodipy FL. Cela fausserait grandement notre statistique d'incorporation.

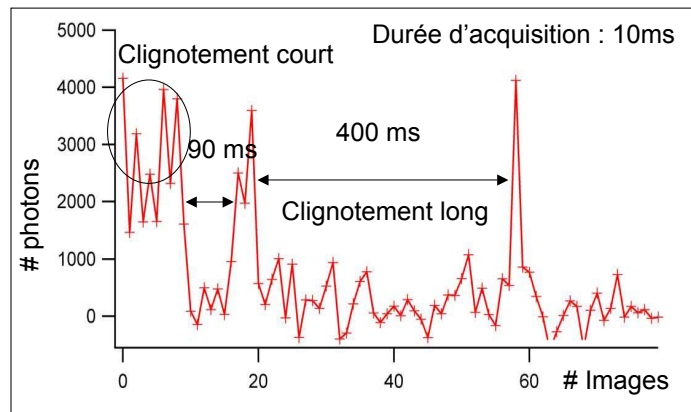


FIG. 3.9 – Evolution de l'émission de fluorescence d'un Bodipy FL unique fixé à un monobrin d'ADN. On entoure la zone du plateau haut où on suspecte du clignotement rapide (1 ms). On peut aussi observer du clignotement long, avec plusieurs centaines de millisecondes entre chaque pic. Intensité moyenne d'excitation sur l'échantillon : 500 W/cm^2 . Temps d'exposition : 10 ms. Tampon TRIS 100 mM, 250 mM NaCl, pH 7,5. Gain EM : 400.

Le clignotement court est probablement un des phénomènes responsables de la dispersion. Nous ne pouvons donc pas ajuster nos résultats expérimentaux de la Figure 3.6 avec

un modèle à deux niveaux. En effet, cette photophysique doit au minimum être décrite avec un modèle à trois niveaux, incluant un état triplet, dit noir car non fluorescent, ayant une durée de vie longue (microseconde à milliseconde) comparée à l'état excité (nanoseconde). Il y a probablement d'autres états noirs, car nous avons différentes durées de vie de clignotement, comme on peut le voir sur la Figure 3.9. Nous ne décrirons qu'un modèle à trois niveaux. Le diagramme de Jablonsky est représenté sur la Figure 3.10.

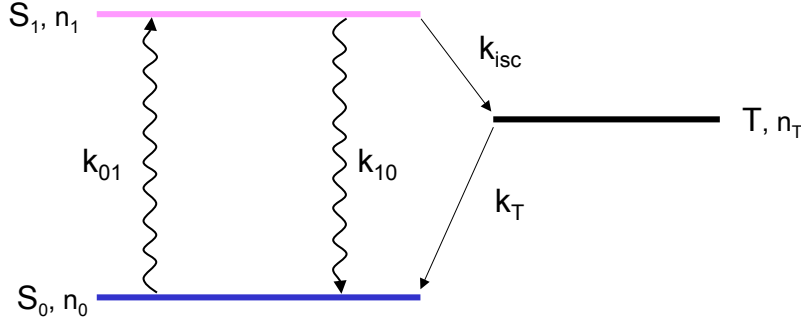


FIG. 3.10 – Diagramme de Jablonsky simplifié pour un système à 3 niveaux. S_0 , S_1 , T sont les différents niveaux, n_0 , n_1 , n_T sont les populations normalisées par la population totale N , k_{01} , k_{10} , k_{isc} , k_T sont les probabilités de transition entre les différents états.

La transition de l'état excité vers l'état triplet a une probabilité plus faible que la transition de l'état excité vers l'état fondamental, donc cet événement est rare. Il se traduit par un clignotement de la molécule observée. On peut résoudre les équations de populations dans ce cas, telles que :

$$\frac{dn_1}{dt} = \frac{\lambda\sigma}{hc} I_{exc} n_0 - (k_{isc} + k_{10}) n_1 \quad (3.8)$$

$$\frac{dn_T}{dt} = k_{isc} n_1 - k_T n_T \quad (3.9)$$

$$n_0 + n_1 + n_T = 1 \quad (3.10)$$

avec I_{exc} l'intensité du faisceau laser d'excitation, et σ la section efficace d'absorption de la molécule. On a $k_{01} = \frac{\lambda\sigma}{hc} I_{exc}$. A l'état stationnaire, on a :

$$\sigma I_{exc} n_0 - (k_{isc} + k_{10}) n_1 = 0 \quad (3.11)$$

$$k_{isc} n_1 - k_T n_T = 0 \quad (3.12)$$

La population de l'état excité n_1 à l'état stationnaire est :

$$n_1 = \frac{\left(1 + \frac{k_{isc}}{k_T}\right)^{-1}}{1 + \frac{I_{sat}}{I_{exc}}} \quad (3.13)$$

avec

$$I_{sat} = \frac{hc}{\lambda\sigma} \frac{k_{isc} + k_{10}}{1 + \frac{k_{isc}}{k_T}} \quad (3.14)$$

I_{sat} est l'intensité de saturation du système. Le taux de fluorescence sera :

$$\Gamma = k_{10}n_1 = k_{10} \frac{\left(1 + \frac{k_{isc}}{k_T}\right)^{-1}}{1 + \frac{I_{sat}}{I_{exc}}} \quad (3.15)$$

D'après l'équation de l'intensité de saturation, ce système va saturer plus vite en intensité qu'un système à deux niveaux, mais aura le même comportement général. On voit ici l'influence de l'état triplet. Nous avons ici défini le régime de fluorescence d'un système à trois niveaux. Pour limiter l'influence de l'état triplet, responsable du clignotement, il serait intéressant de l'inhiber à l'aide d'autres molécules.

3.3.3 Durée de vie du Bodipy FL en présence d'oxygène dans la solution.

On a fait plusieurs mesures de durée de vie, cela avec des durées d'acquisition différentes (100 ms, 50 ms, 20 ms), comme on peut le voir sur la Figure 3.11. Pour chacune des mesures, nous avons une durée de vie du même ordre de grandeur que la durée d'acquisition. On en déduit que notre durée d'acquisition est trop longue pour faire une mesure de durée de vie pertinente dans ces conditions. On ne peut malheureusement pas descendre en dessous de 20 ms de durée d'acquisition, car notre caméra ne nous le permet pas. A partir de ce seuil, le rapport signal sur bruit n'est plus suffisant pour discriminer les Bodipy FL du fond. Nous sommes ici limités par le bruit de lecture et le bruit d'amplification de la caméra, et non plus par le bruit de la fluorescence de la lamelle de verre. La faible intensité de fluorescence du Bodipy FL et le bruit issu de la caméra nous obligent à travailler à des temps d'exposition (et donc d'acquisition) plus élevés que la durée de vie du Bodipy FL dans ces conditions expérimentales.

3.3.4 Prise en compte du photoblanchiment.

D'après l'analyse de la durée de vie du Bodipy FL, nous avons une durée de vie inférieure à 20 ms. Nous sommes amenés à repenser les résultats obtenus sur l'intensité de saturation du Bodipy FL. En effet, pour une intensité d'excitation inférieure à I_{sat} , l'intensité de fluorescence a un comportement linéaire. Donc, si on estime la durée de vie à 20 ms à I_{sat} , valeur la plus élevée d'après nos résultats, elle devrait être de 40 ms à $I_{sat}/2$, 60 ms à $I_{sat}/3$... Dans cet exemple, on voit bien que la durée de vie n'atteindra 100 ms, soit la durée d'acquisition de nos images, qu'à $I_{sat}/5$. Avec un tel temps d'exposition, la majorité des Bodipy FL auront photoblanchi avant la fin de l'acquisition de la première image, bien avant d'atteindre la vraie valeur de I_{sat} . Nous avons alors une valeur de I_{sat} sous-estimée par rapport à la valeur réelle. Ce qu'on observe ici, c'est le nombre de photons maximal N_{max} (hauteur du plateau dans la courbe de saturation) émis par les Bodipy FL avant photoblanchiment. Les seuls points n'ayant pas photoblanchi à la fin de la première image sont ceux qui ont reçu de très faibles intensités. Ils correspondent à une zone du graphique où nous avons très peu de points ayant un rapport signal sur bruit supérieur à 3, donc peu intéressante pour avoir une grande statistique. De même, nous ne pouvons pas mesurer un taux de fluorescence du Bodipy FL à saturation (le nombre de photons de fluorescence collectés normalisé par la durée d'exposition) car sa durée de vie est trop courte devant la durée d'exposition. Ce taux de fluorescence aurait une valeur aberrante dans nos conditions d'observation.

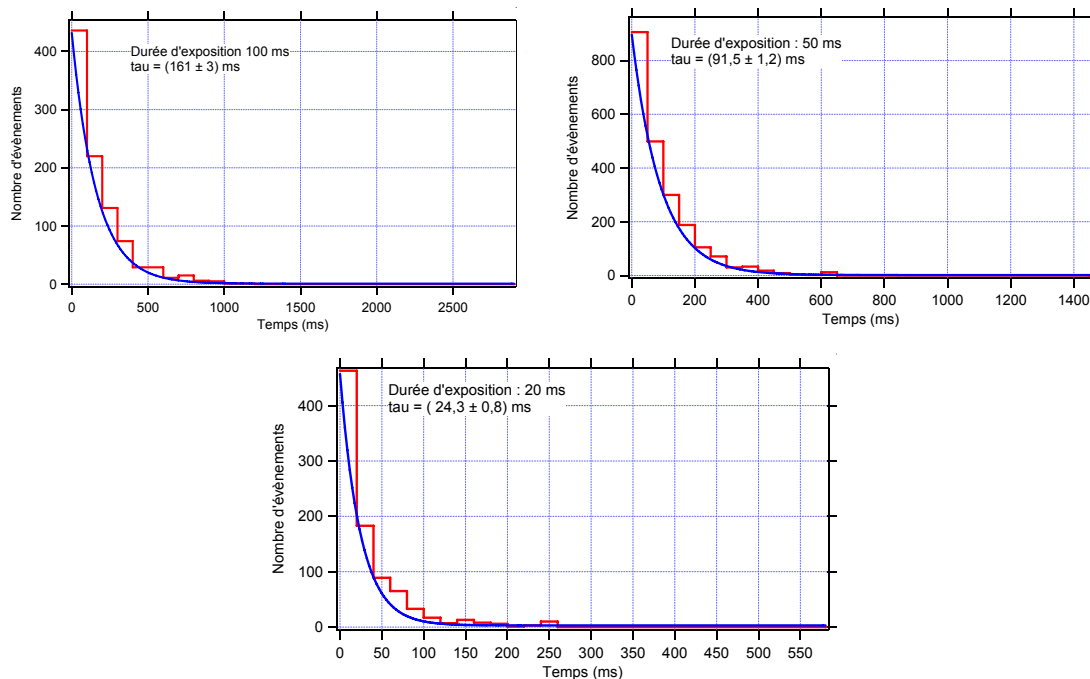


FIG. 3.11 – Durées de vie du Bodipy FL à différentes durées d'exposition (100 ms, 50 ms, 20 ms) et pour une intensité d'excitation I_{sat} à plus ou moins 10%, soit des niveaux de gris de 134 à 100 ms, 67 à 50 ms, et 27 à 20 ms.

3.3.5 Conclusion

Dans cette partie, nous avons élaboré une méthode pour évaluer l'intensité de fluorescence des Bodipy FL, pour une excitation donnée. A partir de cette méthode, nous avons obtenu différentes grandeurs caractéristiques du Bodipy FL dans un tampon contenant de l'oxygène. Nous avons déterminé le nombre maximal de photons émis par le Bodipy FL, ainsi que son intensité de saturation. La durée de vie du Bodipy FL, inférieure à 20 ms, nous oblige à améliorer la durée de vie du Bodipy FL pour avoir des valeurs pertinentes. Pour cela, nous allons utiliser un milieu appauvri en oxygène.

3.4 Photophysique individuelle du Bodipy FL dans un milieu appauvri en oxygène.

L'état triplet défini dans le paragraphe précédent est très sensible à l'oxygène dissout dans la solution tampon. En effet, celui-ci va interagir avec l'état triplet pour accélérer l'arrivée de l'électron dans l'état fondamental. A ceci, il existe une contrepartie. L'oxygène ayant absorbé l'énergie de l'électron du fluorophore pour l'ammener de l'état triplet à l'état fondamental, devient très réactif et va oxyder la molécule fluorescente, et la photoblanchit. Il est intéressant d'éliminer cet oxygène pour obtenir une durée de vie du fluorophore plus grande. Plusieurs moyens sont utilisés pour y parvenir. On peut travailler dans un milieu anaérobie, en saturant la solution tampon avec un gaz inerte, comme de l'azote ou de l'argon, ou en travaillant sous vide [47]. Ce système est lourd à utiliser, et nécessite de préparer l'échantillon dans un environnement pauvre en oxygène. Une autre solution consiste à utiliser des molécules biologiques qui absorbent l'oxygène lors d'une réaction chimique. Ces enzymes sont couramment utilisées dans des observation de systèmes bio-

logiques en molécule unique. Nous avons testé deux systèmes enzymatiques. Le premier, appelé GODCAT pour glucose oxydase et catalase, est utilisé depuis longtemps dans des expériences de FRET (Fluorescence Resonant Energy Transfert) notamment [38]. Le second, apparu plus récemment dans la littérature, est le PCA/PCD, où le PCA est l'acide protocachéchuique, et le PCD est l'enzyme protocatechuate-3,4-dioxygénase [39]. Nous allons décrire ces deux systèmes, ainsi que les résultats qu'ils ont permis d'obtenir.

3.4.1 Effet d'un milieu appauvri en oxygène sur le Bodipy FL.

Système enzymatique GODCAT.

Le système GODCAT est composé du couple glucose oxydase et catalase dans un tampon contenant une concentration millimolaire de glucose. La glucose-oxydase catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et acide gluconique qui se transforme spontanément en gluconolactone. La catalase va transformer une unité d'eau oxygénée en une demi-unité d'oxygène et une molécule d'eau (voir schéma Figure 3.12). Ce système permet au final de consommer une demi-unité d'oxygène par cycle complet.

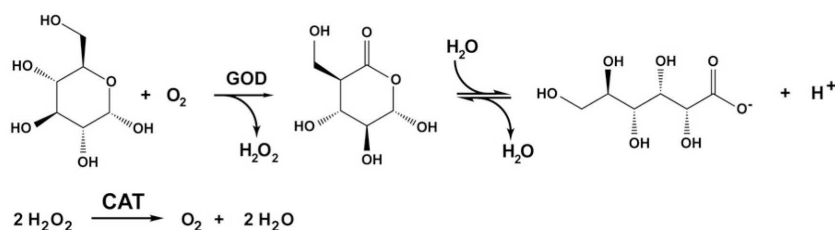


FIG. 3.12 – Description des réactions chimiques impliquées par le système enzymatique GODCAT déplaçant la solution en oxygène. Figure issue de la référence [39].

Nous avons appliqué ce système au Bodipy FL, en utilisant le protocole suivant :

1. on dilue la glucose oxydase (*Aspergillus niger*, Sigma) à 5 mg/ml dans de l'eau milliQ. On fait attention à ne pas agiter la solution pour ne pas y dissoudre de l'oxygène ;
2. on dilue dans un autre tube la catalase (Bovine liver, Sigma) à 1 mg/ml dans de l'eau milliQ ;
3. on prépare une solution de glucose à 30% (w/V) dans de l'eau milliQ ;
4. on mélange ensuite 10 μ l de solution de glucose oxydase (0,1 g/l final), 10 μ l de solution de catalase (0,02 g/l final), 50 μ l de solution de glucose (3% V/V), 70 μ l de tampon Tris (100 mM) salé (NaCl 250 mM) 2X et on finit la dilution avec 360 μ l de tampon Tris salé 1X. On a un volume final de 500 μ l. Nous effectuons le mélange 10' avant l'injection dans la cellule, pour être sûr d'être à la concentration minimale en oxygène (14 μ M d'après [39]). Nous vérifions la faible concentration en oxygène avec un test à la resazurine (bleu initialement, vire au rose sans oxygène).

Nous observons cet échantillon en TIRFM. Nous vérifions bien que nous avons des Bodipy FL à la surface, cela sans système enzymatique. Puis, nous injectons le tampon contenant le système enzymatique GODCAT. On ne voit plus les Bodipy FL, pour la même intensité d'excitation. Nous avons déjà réalisé cette étude [48], et même si le rapport signal sur bruit diminuait dans le GODCAT par rapport au TRIS, nous pouvions toujours distinguer la fluorescence de Bodipy FL uniques. Maintenant, ce n'est plus le cas. On pense que le système enzymatique est mieux préparé (on ne vortexe plus l'échantillon par exemple), ou que l'échantillon est observé plus fraîchement. Nous déduisons de ces

observations que la majorité des Bodipy FL sont dans un état noir pendant la majeure partie de l'acquisition, et sont donc peu visibles (Figure 3.13). On explique cette situation par le fait que la concentration en oxygène est trop faible pour que celui-ci amène rapidement le Bodipy FL de l'état triplet vers l'état fondamental. Donc le fluorophore passe plus de temps dans l'état triplet, et cycle moins vite. C'est un problème soluble avec l'ajout de molécules ayant le même rôle que l'oxygène (voir plus loin). Si on rince la cellule avec un tampon sans GODCAT, nous retrouvons le signal observé initialement.



FIG. 3.13 – Images d'un échantillon de Bodipy FL prises successivement (à des zones différentes) avant injection de GODCAT (gauche), avec GODCAT (milieu) et après rinçage du GODCAT avec un tampon tris salé (droite). Durée d'acquisition : 100 ms. Intensité moyenne du faisceau incident $I = 400 \text{ W/cm}^2$ @ 488 nm.

Un problème a été aperçu lors de l'utilisation du GODCAT. Au bout d'une heure de présence de la solution GODCAT dans la cellule, nous avons observé une augmentation importante du fond, qui ne part pas au rinçage avec un tampon Tris salé. On n'a pas observé cet inconvénient pour le système PCA/PCD. On pense que c'est la production d'eau oxygénée, qui n'est plus consommée par la catalase au bout d'un certain temps, qui détériore la surface (sûrement par oxydation) en augmentant le fond de fluorescence, rendant la détection potentielle des Bodipy FL impossible. Ceci n'était pas observé dans l'étude précédente [48], sûrement parce que la catalase était plus récente. Ce problème nous impose de refaire une solution de GODCAT pour chaque expérience, celle-ci ne se conservant pas plus d'une heure.

Action du système enzymatique PCA/PCD.

Dans ce cas là, nous nous basons sur l'article de Aitken et al. [39]. Dans cet article, les auteurs montrent que ce système enzymatique présente des performances supérieures au système GODCAT. En effet, la concentration en oxygène descend plus rapidement et plus bas, pour des concentrations en enzymes identiques au système GODCAT (3 μM contre 14 μM d'oxygène dissout respectivement). La réaction chimique d'oxydation du PCA (acide protocatéchuïque) catalysée par le PCD est la suivante :

Le protocole appliqué est :

1. On dissout le PCA (Sigma) dans de l'éthanol pour arriver à une concentration de 1 M. On dilue ensuite cette solution mère à 100 mM avec du tampon Tris (50 mM) plus KCl(50 mM), pH 7,5.
2. On dissout l'enzyme PCD (Pseudomonas species, Sigma) dans le tampon cité ci-dessus à 250 nM. Attention, cette enzyme coûte cher, il ne faut pas en perdre !
3. On mélange ensuite 50 μl de PCA (9 mM final) avec 500 μl de PCD (230 nM final) 10 minutes avant de mettre cette solution dans la cellule microfluidique.

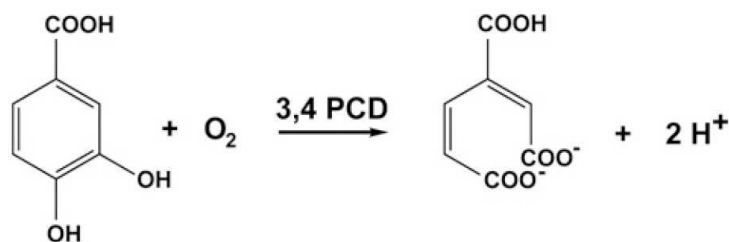


FIG. 3.14 – Equation de la réaction chimique consommant de l'oxygène utilisant le couple PCA/PCD, d'après [39]. Le PCA est la molécule située à gauche.

Nous observons le même résultat qu'avec le GODCAT, c'est-à-dire du signal avant l'injection, puis plus rien avec le système PCA/PCD, puis à nouveau du signal après rinçage avec un tampon sans système enzymatique. Il y a quand même une différence notable. Le fond de fluorescence n'augmente pas avec le temps, la cellule ne se dégrade pas après plusieurs heures d'observation. Cela tend à confirmer notre hypothèse sur l'action de l'eau oxygénée dans la solution GODCAT. Nous allons maintenant travailler avec le couple PCA/PCD, car il est plus simple d'utilisation, il se conserve, et il ne dégrade pas l'environnement de notre échantillon. En effet, dans le cadre d'une application au ribosome, il est préférable de ne pas avoir de produit fortement oxydant (comme l'eau oxygénée), pour ne pas dégrader la liaison entre la petite sous-unité et la grande sous-unité du ribosome.

3.4.2 Addition d'anti-oxydants au système enzymatique.

Pour pallier le problème de passage dans l'état noir pendant de longues périodes lors de l'utilisation de systèmes enzymatiques tels que GODCAT ou PCA/PCD, divers anti-oxydants ont été utilisés, principalement avec les cyanines, les Alexas et les ATTOS. Le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique, Sigma) notamment a prouvé son efficacité dans différentes études [38, 39, 40]. Cette molécule est un équivalent soluble dans l'eau (jusqu'à 2 mM) de la vitamine E. Les différentes études ont montré une nette amélioration de la stabilité du taux de fluorescence du Cy5 et du ATTO655, ainsi qu'une augmentation de la durée de vie avant photoblanchiment. Nous l'avons appliqué au Bodipy FL, avec un système enzymatique déplaçant la solution en oxygène. Cela n'a rien changé à l'émission de fluorescence, c'est-à-dire que le Bodipy FL est resté la majeure partie du temps de l'acquisition dans l'état triplet, n'émettant pas de photons de fluorescence. Le Trolox ne fonctionne donc pas dans le cas du Bodipy FL.

Toujours dans ces études, plusieurs anti-oxydants, voir couples d'anti-oxydants, ont été utilisés (n-Propylgallate (nPG), 4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), acide ascorbique, β -mercaptoethanol (BME), mercaptoéthylamine (MEA)...), avec des succès variés. Ces différents produits ont été testés empiriquement pour leurs propriétés anti-oxydantes, le mécanisme exact n'étant pas vraiment compris. Nous en avons essayé plusieurs (acide ascorbique, BME, nPG) sans observer d'amélioration. Il nous a fallu donc mieux comprendre les phénomènes de clignotement et de photoblanchiment pour utiliser un système vraiment efficace.

3.4.3 Utilisation d'un couple oxydant-réducteur : le système ROXS.

En 2008, une étude a montré comment minimiser le phénomène de clignotement et augmenter la durée de vie de n'importe quelle molécule fluorescente synthétique [42],

dans un milieu pauvre en oxygène (avec GODCAT ou PCA/PCD). Cette technique porte l'acronyme de ROXS, pour "Reducing and OXYdizing System". Elle utilise deux composants chimiques, un oxydant, l'autre réducteur, qui remplacent l'action de l'oxygène pour ramener la molécule dans son état fondamental, sans la dégrader (photoblanchiment). Ceux-ci doivent être adaptés pour les potentiels redox du fluorophore étudié. L'action du ROXS est décrite dans la Figure 3.15.

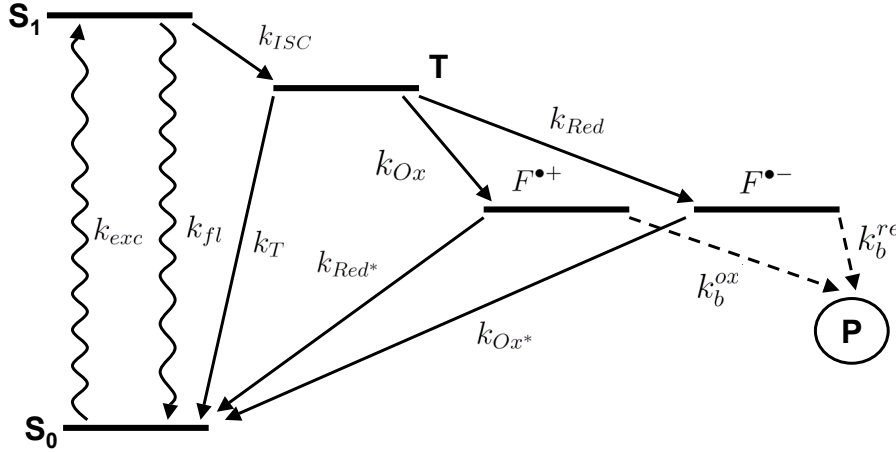


FIG. 3.15 – Schéma de principe du système ROXS (Reducing and OXYdizing System), issu de [42]. On représente ici le diagramme de Jablonsky du fluorophore étudié, avec S_0 , S_1 , T respectivement l'état fondamental, excité et triplet de la molécule. $F^{\bullet+}$ et $F^{\bullet-}$ sont les états provenant respectivement d'une oxydation et d'une réduction de l'état triplet. P désigne l'état photoblanchi de la molécule. Les différents taux de transition sont k_{ISC} de l'état excité vers le triplet, k_{exc} de l'état fondamental vers l'état excité, k_{fl} de l'état excité vers l'état fondamental (radiatif, fluorescence). Dans le cas du système ROXS, l'état triplet est rapidement déplété de son électron par une oxydation, avec par exemple le méthylviologène, ou une réduction, avec par exemple l'acide ascorbique, pour former un radical-cation $F^{\bullet+}$ ou un radical-anion $F^{\bullet-}$. Pour revenir vers l'état fondamental, la molécule ayant été oxydée, va maintenant être réduite (avec l'acide ascorbique), celle ayant été réduite va être oxydée (par le méthylviologène). De part leurs positions respectives sur l'échelle des énergies d'oxydo-réduction, le méthylviologène et l'acide ascorbique se régénèrent automatiquement à la fin de la réaction. Ce système permet de réduire considérablement la durée de vie de l'état triplet, et donc de stabiliser l'émission du fluorophore. Ce système n'est valable que pour une faible concentration d'oxygène dissout, donc associé à un système GODCAT ou PCA/PCD.

Dans le cas de l'article [42], on montre son efficacité sur l'ATTO647N. Il est aussi montré que ce système est efficace sur le Cy5, le Cy3B et l'ATTO565. Avant de montrer son efficacité sur le Bodipy FL, nous allons expliquer son action.

Les équations d'oxydo-réduction du système ROXS.

Pour vérifier si l'oxydant et le réducteur sont vraiment efficaces pour dépléter l'état triplet en électron, nous allons calculer la variation d'enthalpie libre pour chaque réaction d'oxydo-réduction, qui entraînera une séparation de charge, afin de savoir si la réaction voulue aura bien lieu. Nous utilisons l'équation de Rehm-Weller [49] :

$$\Delta G = e [E_{ox} - E_{red}] - E_{0,0} \quad (3.16)$$

3.4. PHOTOPHYSIQUE INDIVIDUELLE DU BODIPY FL DANS UN MILIEU APPAUVRI EN

où ΔG est la variation d'enthalpie libre pour une séparation de charge, E_{ox} est le premier potentiel d'oxydation à un électron du donneur, E_{red} est le premier potentiel de réduction à un électron de l'accepteur, e est la charge unité, $E_{0,0}$ est l'énergie d'excitation du fluorophore.

Les agents utilisés ici pour faire la réaction d'oxydo-réduction sont l'acide ascorbique (AA) (Sigma) comme réducteur et le méthylviologène (MV) (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridium chlorate hydrate) comme oxydant.

Le calcul a été fait pour le Cy5 [42], nous allons l'appliquer au cas du Bodipy FL. Nous devons d'abord définir les valeurs des différents potentiels redox en jeu dans le cas du Bodipy FL. Le potentiel de réduction $E_{red}^\circ(\text{Bod})$ du Bodipy FL pour passer de l'état fondamental vers l'état radical-anion $\text{Bod}^{\bullet-}$ a été mesuré [46] pour une électrode normale à hydrogène, et vaut -0,83 V. Cela donne $E_{red}^\circ = E^\circ(\text{Bod}/\text{Bod}^{\bullet-}) = -1,07$ V pour une électrode au calomel saturé (ECS). L'énergie d'excitation $E_{0,0}(\text{Bod})$ du Bodipy FL est de 2,43 eV. On peut aussi calculer cette énergie d'excitation à partir de la longueur d'onde d'absorption ($\lambda_{abs} = 502$ nm) et d'émission ($\lambda_{em} = 511$ nm) du Bodipy FL :

$$E_{0,0} = \left(\frac{hc}{\lambda_{abs}} - \frac{hc}{\lambda_{em}} \right) \quad (3.17)$$

ce qui donne pour le Bodipy FL : $E_{0,0}(\text{Bod}) = 2,45$ eV. Cette valeur est très proche de celle déterminée dans [46], c'est celle que nous considérerons par la suite.

Il nous manque la valeur du potentiel d'oxydation $E_{ox}^\circ = E^\circ(\text{Bod}/\text{Bod}^{\bullet+})$ du Bodipy FL pour passer de l'état fondamental vers l'état radical-cation $\text{Bod}^{\bullet+}$. D'après [50], nous avons $E^\circ(\text{Bod}/\text{Bod}^{\bullet+}) = 1,17$ V par rapport à l'ECS.

De ces deux valeurs, nous pouvons déduire les potentiels effectifs suivant pour le Bodipy FL dans l'état excité singulet :

$$\begin{aligned} E^\circ(\text{Bod}^*/\text{Bod}^{\bullet-}) &= \frac{E_{0,0}}{e} + E_{red}^\circ = +1,38 \text{ V} \\ E^\circ(\text{Bod}^{\bullet+}/\text{Bod}^*) &= -\frac{E_{0,0}}{e} + E_{ox}^\circ = -1,28 \text{ V} \end{aligned}$$

On fait de même avec l'état triplet, en appliquant toutefois un écart énergétique entre l'état S_1 et l'état T de $\Delta_{S_1 \leftrightarrow T} = 0,28$ eV [42],

$$\begin{aligned} E^\circ(\text{T}/\text{Bod}^{\bullet-}) &= \frac{E_T}{e} + E^\circ(\text{Bod}^*/\text{Bod}^{\bullet-}) = +1,10 \text{ V} \\ E^\circ(\text{Bod}^{\bullet+}/\text{Bod}^*) &= -\frac{E_T}{e} + E^\circ(\text{Bod}^{\bullet+}/\text{Bod}^*) = -1,00 \text{ V} \end{aligned}$$

D'après [42], nous avons les potentiels de réduction du méthylviologène et d'oxydation de l'acide ascorbique, par rapport à l'ECS :

$$\begin{aligned} E(\text{MV}/\text{MV}^{\bullet-}) &= -0,45 \text{ V} \\ E(\text{AA}^{\bullet+}/\text{AA}) &= 0,06 \text{ V} \end{aligned}$$

Nous pouvons maintenant représenter sur deux échelles les potentiels oxydo-réducteurs des différents acteurs de la réaction, suivant que le Bodipy FL se trouve dans l'état fondamental ou excité (Figure 3.16).

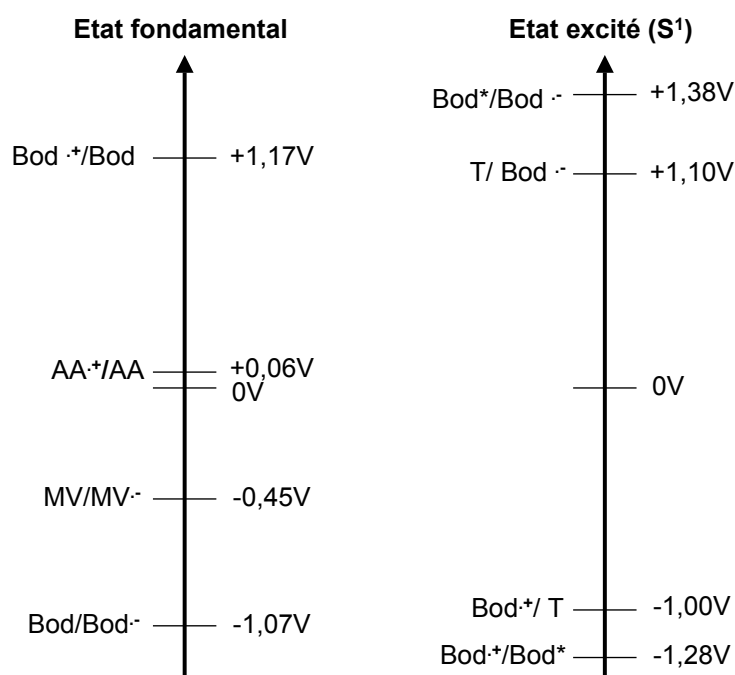


FIG. 3.16 – Echelles des potentiels redox du Bodipy FL, de l'oxydant, le méthylviologène (MV), et du réducteur, l'acide ascorbique (AA). Sur l'échelle de gauche sont représentés les potentiels redox pour le Bodipy FL dans l'état fondamental, sur celle de droite les différents potentiels redox pour le Bodipy FL dans l'état excité. Sur chaque échelle, on note sur la gauche l'état où se trouve chaque espèce, sur la droite le potentiel redox en Volt. Bod^{•-} définit le radical-anion, Bod^{•+} définit le radical-cation, Bod^{*} définit la molécule dans l'état excité S₁, T définit le Bodipy FL dans l'état triplet. Si on souhaite avoir un diagramme de Jablonsky, il suffit de reporter ces notations sur la Figure 3.15.

Processus réductif Le Bodipy FL se situe dans l'état triplet T, une réduction par l'acide ascorbique l'amène vers l'état radical-anion (étape 1), puis une oxydation par le méthylviologène amène le radical-anion vers l'état fondamental (étape 2), et enfin le méthylviologène réduit et l'acide ascorbique oxydé se régénèrent (étape 3). Nous calculons le ΔG pour chaque étape pour voir si le transfert de l'électron est possible.

$$\text{Etape 1 : } \Delta G = e(E^\circ(AA^{\bullet+}/AA) - E^\circ(T/Bod^{\bullet-})) = e(0,06 - 1,10) = -1,04 \text{ eV}$$

On peut aussi l'écrire :

$$\Delta G = e(E^\circ(AA^{\bullet+}/AA) - E_{red}^\circ) - (E_{0,0} - \Delta_{S_1 \leftrightarrow T})$$

$$\text{Etape 2 : } \Delta G = e(E^\circ(Bod/Bod^{\bullet-}) - E(MV/MV^{\bullet-})) = e(-1,07 + 0,45) = -0,62 \text{ eV}$$

On doit aussi voir si le méthylviologène et l'acide ascorbique se régénèrent bien entre eux :

$$\text{Etape 3 : } \Delta G = e(E(MV/MV^{\bullet-}) - E(AA^{\bullet+}/AA)) = e(-0,45 - 0,06) = -0,51 \text{ eV}$$

Les ΔG sont largement négatifs pour chaque étape, donc ces réactions sont bien spontanées. Ceci est prédictible avec la règle du gamma. La valeur de ΔG permet de quantifier à quel point ces réactions d'oxydo-réduction sont favorables. Le ROXS doit être efficace avec le Bodipy FL dans le cas d'un processus réductif. Nous résumons ce processus dans le schéma suivant (Figure 3.17).

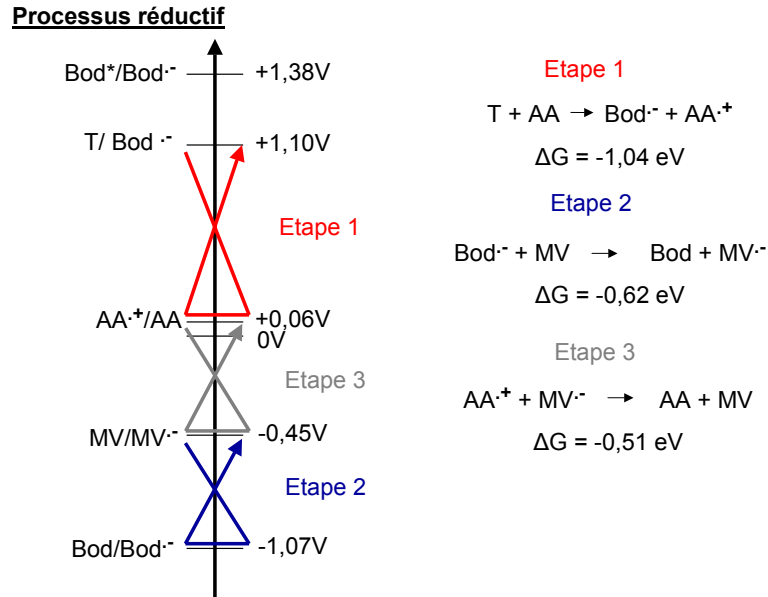


FIG. 3.17 – Action du ROXS sur le Bodipy FL dans le cas d'un processus réductif. À droite, nous avons les différentes équations redox.

Processus oxydatif Nous allons reprendre le même schéma dans ce cas. Ici, le méthylviologène va oxyder le Bodipy FL (dans l'état triplet) pour l'amener vers l'état radical-cation (étape 1). Ensuite l'acide ascorbique va réduire le radical-cation pour l'amener vers l'état fondamental (étape 2). L'étape 3, qui est le retour du méthylviologène et de l'acide ascorbique dans leurs états initiaux, est inchangée.

$$\text{Etape 1 : } \Delta G = e(E^\circ(Bod^{\bullet+}/T) - E_{MV/MV^{\bullet-}}) = e(-1,00 + 0,45) = -0,55 \text{ eV}$$

On peut aussi l'écrire :

$$\Delta G = e (E_{ox}^\circ - E_{MV/MV^{\bullet-}}) - (E_{0,0} - \Delta_{S_1 \leftrightarrow T})$$

$$\text{Etape 2 : } \Delta G = e (E_{AA^{\bullet+}/AA}^\circ - E^\circ(Bod^{\bullet+}/Bod)) = e(0,06 - 1,17) = -1,11 \text{ eV}$$

Comme pour le cas réductif, nous pouvons résumer les différents processus dans un schéma (Figure 3.18).

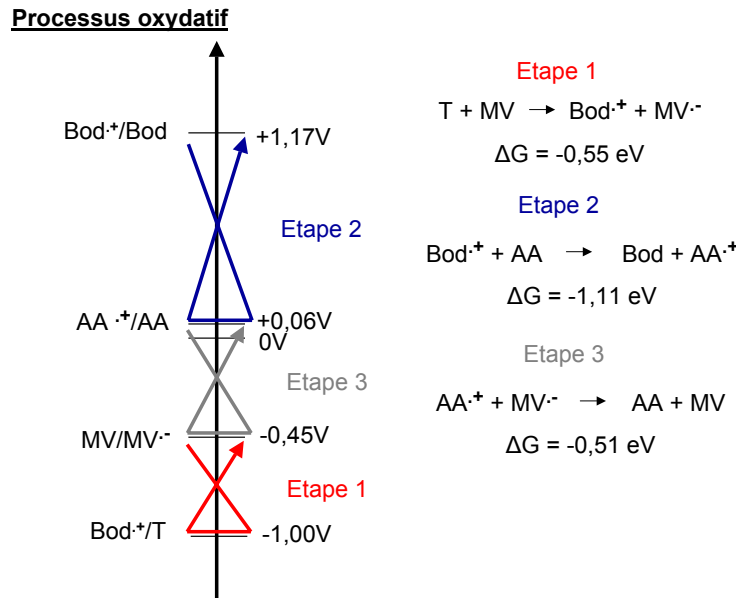


FIG. 3.18 – Action du ROXS sur le Bodipy FL dans le cas d'un processus oxydatif. A droite, nous avons les différentes équations redox.

Dans ce cas aussi, le processus doit être efficace car tous les ΔG sont négatifs. Le système ROXS couplé à un système PCA/PCD doit permettre d'améliorer la stabilité du fluorophore en limitant les clignotements, mais aussi d'augmenter la durée de vie du fluorophore avant photoblanchiment. Nous n'avons a priori plus le problème de la durée de vie longue de l'état triplet, comme dans le cas de l'utilisation seule d'un système enzymatique déplaçant la solution en oxygène. L'action du ROXS est de ramener le Bodipy FL de l'état triplet vers l'état fondamental, cela sans détruire le fluorophore comme le fait l'oxygène (photoblanchiment).

Il a été montré que saturer une solution en oxygène permet de stabiliser l'émission des fluorophores, c'est à dire limiter son passage dans l'état noir, mais accélère le photoblanchiment [39]. Grâce au système ROXS, nous sommes a priori capables de stabiliser l'émission de fluorescence du Bodipy FL, tout en retardant son photoblanchiment. Nous devons retrouver ici une durée de vie de l'état triplet comparable à celle en présence d'oxygène. Grâce au ROXS, nous pouvons déterminer la durée de vie du Bodipy FL pour une excitation donnée et voir si l'intensité de saturation déterminée précédemment sans ROXS est la même qu'avec.

3.4.4 Mesure de la durée de vie et d'intensité de saturation du Bodipy FL avec le système ROXS

La mesure de durée de vie du Bodipy FL avec un système PCA/PCD couplé au ROXS nous permettra de voir si ce dernier est vraiment un apport ou non. On rappelle que nos

3.4. PHOTOPHYSIQUE INDIVIDUELLE DU BODIPY FL DANS UN MILIEU APPAUVRI EN

mesures dans un tampon simple (TRIS 100 mM, NaCl 250 mM) nous donnaient une durée de vie inférieure ou égale à 20 ms.

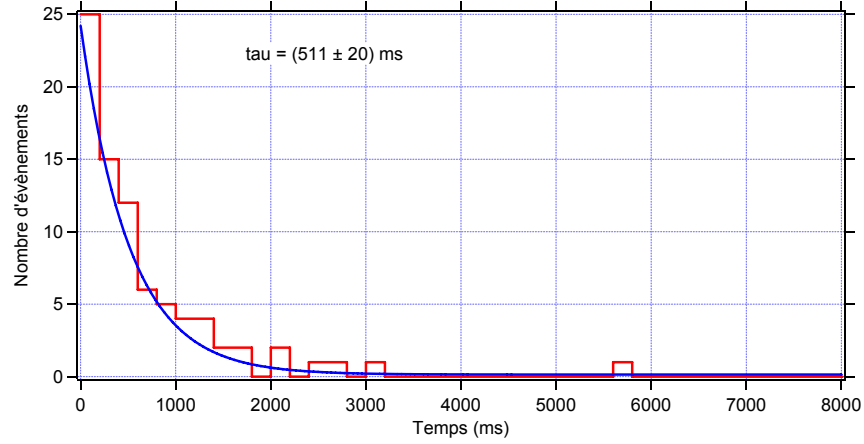


FIG. 3.19 – *Durée de vie du Bodipy FL dans un système PCA/PCD couplé au ROXS. On a une durée de vie de $(511 \pm 20)\text{ms}$, pour des points pris sur un fond ayant 200 niveaux de gris à plus ou moins 10%, ce qui représente 500 W/cm^2 (à plus ou moins 10%) d'intensité d'excitation (onde incidente). Durée d'exposition : 100 ms ; temps de pause : 100 ms.*

Dès la prise de données, on observe que la durée de vie du Bodipy FL est grandement améliorée dans le ROXS. En effet, nous avons une durée de vie d'environ 500 ms en présence de ROXS. Ici, la durée de vie est nettement supérieure à la durée d'acquisition. Donc nous pouvons faire une mesure de l'intensité de saturation pour voir si nous avons diminué la dispersion sur notre mesure.

3.4.5 Mesure de l'intensité de saturation du Bodipy FL avec le système ROXS

Nous reprenons le même cadre expérimental que lors de la première mesure sans système ROXS. Nous avons une durée d'exposition de 100 ms, avec 100 ms de temps de pause entre chaque image. La polarisation du faisceau incident est TM (nous avons déjà précisé que la polarisation n'influe pas sur l'efficacité d'excitation du fluorophore, par contre le facteur de transmission de l'onde incidente vers l'onde évanescente y est plus grand).

On remarque que la dispersion est toujours importante sur ces données (Figure 3.20). La valeur de la saturation qu'on obtient de l'ajustement n'est pas très précise, car on voit sur le nuage de point qu'on ne sature pas le Bodipy FL, et même qu'on est toujours sur la partie croissante d'avant plateau. Sur la Figure 3.22, l'ajustement linéaire et l'ajustement issu du modèle à trois niveaux sont superposés sur le même graphique. L'ajustement linéaire ne semble pas totalement aberrant, alors qu'il l'aurait été pour les données prises sur l'échantillon sans ROXS. La valeur de I_{sat} issue de l'ajustement, 1500 niveaux de gris soit une intensité de $(3,8 \pm 0,2) \text{ kW/cm}^2$ environ, n'est pas très précise, il nous faudrait des données à de plus grandes intensités pour observer le plateau de saturation. En tenant compte du facteur de transmission vers l'onde évanescente, qui est de 2,7 pour un angle d'incidence à 67° (estimation), nous avons une intensité de saturation de 10 kW/cm^2 environ. En ce qui concerne la dispersion, celle-ci provient en partie du clignotement du Bodipy FL qui n'a pas été complètement supprimé avec le ROXS. On peut le voir avec la Figure 3.21, où nous montrons un Bodipy FL présentant un clignotement très

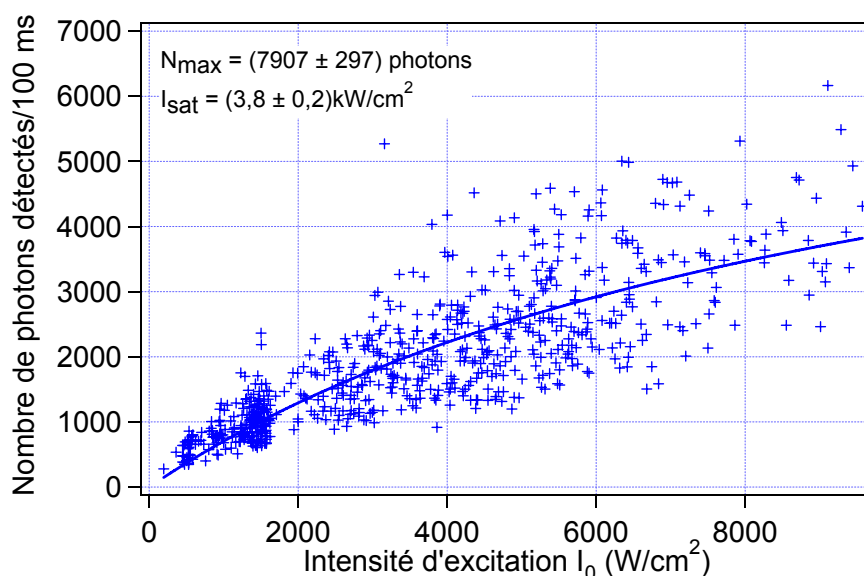


FIG. 3.20 – Mesure de l'intensité de saturation du Bodipy FL en présence du système ROXS. La durée d'acquisition est de 100 ms. Comme dans le cas sans ROXS, nous reportons l'intensité de fluorescence du Bodipy FL sur la première image du film en ordonnée, et la valeur du fond sur la dernière image à la position de la molécule en abscisse. On ajuste avec le modèle présenté précédemment.

important tout le long du film. Cependant, ce type de comportement n'est présent que pour de fortes intensités d'excitation, intensités auxquelles nous ne travaillerons pas dans le cadre de notre étude biologique. D'autre part, la statistique de photoblanchiment des fluorophores organiques fait qu'un certain nombre de Bodipy FL auront photoblanchi pendant la première image, à des temps variés. Ceci ajoute aussi de la dispersion.

On en déduit que nous n'avons pas parfaitement ramené la durée de vie de l'état triplet à sa valeur dans le TRIS, et donc que le ROXS n'est pas complètement efficace.

Pour vérifier l'action de l'oxydant et du réducteur, nous avons fait différents tests, toujours avec le système PCA/PCD. Si nous ne mettons que de l'acide ascorbique dans le tampon, sans méthylviologène, nous avons un signal équivalent à celui avec PCA/PCD seul. Si nous mettons que du méthylviologène dans la solution, nous avons un signal équivalent au système ROXS complet. On a aussi échangé l'acide ascorbique avec du Trolox, sans voir de changement sur le clignotement. Ce dernier résultat était prévisible, car lors de l'étude du Trolox avec le Bodipy FL, nous n'avions constaté aucune amélioration dans le signal de ce dernier, alors que le Trolox tend à s'oxyder au cours du temps pour former une molécule complémentaire, le Trolox-quinone. Celle-ci est oxydante, alors que le Trolox est réducteur, et donc ce couple agit comme le ROXS sur le Cy5 et certains ATTO [41].

L'inactivité de l'acide ascorbique dans le cas du Bodipy FL est assez troublante, car les calculs montrent qu'il est potentiellement un bon réducteur pour ce dernier. C'est d'autant plus étonnant qu'on ne comprend pas comment le Bodipy FL peut aller de l'état $F^{\bullet+}$ à l'état fondamental sans être réduit par l'acide ascorbique.

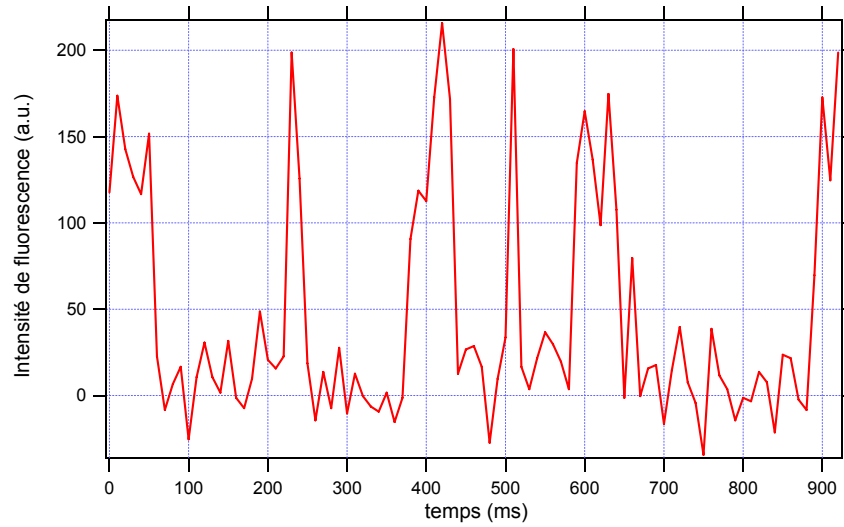


FIG. 3.21 – *Evolution de la fluorescence d'un Bodipy FL avec ROXS. Durée d'acquisition : 10 ms. 100 ms de temps de pause. Intensité incidente : 500 W/cm². Nombre d'images du film : 95.*

3.4.6 Comparaison des intensités de saturation du Bodipy FL avec et sans ROXS.

Comparaison des intensités de saturation sur l'ensemble des données.

On place les données de la Figure 3.8 et de la Figure 3.20, avec leurs ajustements respectifs sur un même graphique. (Figure 3.22).

La comparaison des deux courbes de saturation, avec et sans ROXS, donne des résultats très différents au niveau de l'intensité de saturation. On explique cela de la manière suivante. Vu que dans le cas d'un échantillon sans ROXS, la durée de vie du Bodipy FL est très faible, soit inférieure ou égale à 20 ms à I_{sat} , et que nos images sont prises à 100 ms de durée d'acquisition, les Bodipy FL ont photoblanchi bien avant la fin de l'acquisition de la première image. A priori, les Bodipy FL auront même photoblanchi avant la fin de l'acquisition de la première image pour des intensités inférieures à la "vraie" I_{sat} . Autrement dit, si on estime que les Bodipy FL vont émettre un nombre moyen constant de photons, ils auront émis tous leurs photons avant la fin de l'acquisition de la première image, pour des intensités inférieures à I_{sat} théorique. Cela va avoir pour effet de diminuer artificiellement I_{sat} mesurée à cause de conditions expérimentales non satisfaisantes.

Dans le cas de l'échantillon avec ROXS, la durée de vie du Bodipy FL est grande devant la durée de l'acquisition, 500 ms à 200 niveau de gris (500 W/cm² d'intensité de l'onde incidente), donc ils n'ont pas photoblanchi en majorité à la fin de l'acquisition de la première image. On peut donc augmenter considérablement l'intensité d'excitation avant d'être limité comme dans le cas sans ROXS, et cela jusqu'à arriver à saturation. Dans le cadre de notre montage, nous ne pouvons aller au delà de 160 mW à l'entrée du microscope, soit 3,5 kW/cm². Il faudrait diminuer la taille du faisceau pour avoir une intensité plus grande, pour arriver au delà de 3,8 kW/cm² environ, afin d'espérer voir la saturation du Bodipy FL dans nos conditions.

Comparaison des intensités de saturation à faible intensité d'excitation.

Il est intéressant d'agrandir la zone correspondante aux données allant de 0 à 300 niveaux de gris (Figure 3.23). On remarque que l'ajustement sans ROXS présente un

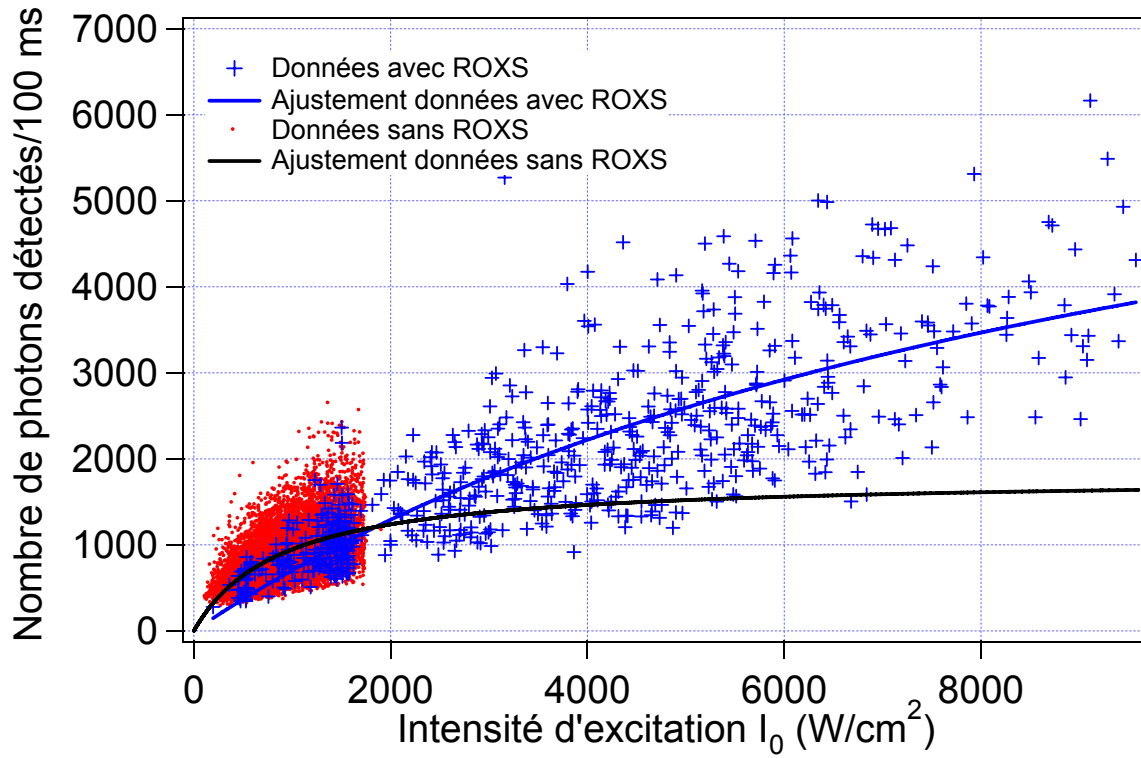


FIG. 3.22 – Intensité de saturation du Bodipy FL sans ROXS (rouge) et avec ROXS (bleu). Dans le premier cas, nous avons une saturation à $I_{sat} = (132 \pm 4)$ niveaux de gris ($N_{max} = (1794 \pm 25)$ photons), et, dans le second, on a $I_{sat} = (1517 \pm 85)$ niveaux de gris ($N_{max} = (7910 \pm 300)$ photons).

nombre de photons émis plus important que celui avec ROXS jusqu'à un niveau de gris de 270 environ. Nous expliquons ceci par le fait que l'oxygène présent dans la solution est plus efficace pour diminuer la durée de vie de l'état triplet que le ROXS utilisé ici. En effet, nous avons dit précédemment que l'action du ROXS était incomplète, car le Bodipy FL clignote encore beaucoup en présence du ROXS, et que l'acide ascorbique n'a pas d'effet remarquable, comme pour d'autres fluorophores [42]. Donc à ces intensités, le Bodipy FL a un taux de fluorescence plus élevé en présence d'oxygène qu'avec le ROXS. Pour des intensités plus élevées, le photoblanchiment rapide des Bodipy FL en présence d'oxygène limite le nombre de photons émis, alors qu'avec le ROXS, le nombre de photons émis continue d'augmenter grâce à une durée de vie bien plus longue. C'est encore un effet de la durée de l'acquisition des images, qui est beaucoup plus grande que la durée de vie des Bodipy FL en présence d'oxygène, et plus courte que celle en présence de ROXS.

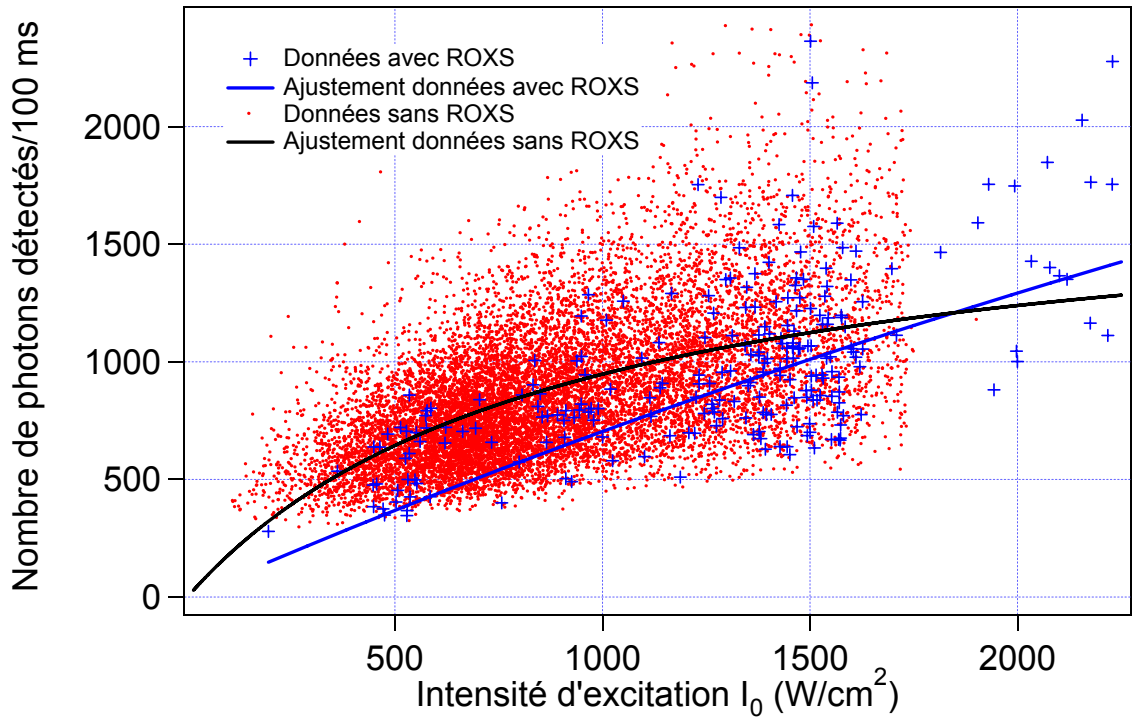


FIG. 3.23 – Agrandissement du début de la courbe de saturation de la Figure 3.22.

Evaluation de I_{sat} pour le Bodipy FL.

On peut faire un calcul d'ordre de grandeur pour savoir quelle intensité de saturation on doit trouver. On reprend l'équation 3.14, où est donnée l'expression littérale de I_{sat} dans un système à 3 niveaux. On prend les valeurs des différents taux de transitions pour un Bodipy proche du Bodipy FL [51], on obtient une valeur de I_{sat} de 41 kW/cm^2 ($k_{10} = 1,67 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \pm 2\%$, $k_{ISC} = 3,97 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \pm 30\%$, $k_T = 6,09 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \pm 10\%$, $\sigma = 2,25 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ à 488 nm , $\lambda_{em} = 502 \text{ nm}$). Il y a un facteur 10 entre la valeur prévue par l'ajustement des données actuelles avec un échantillon dans ROXS, $(3,8 \pm 0,2) \text{ kW/cm}^2$, et celle prévue par le calcul. Il ne faut pas oublier que la valeur de $(3,8 \pm 0,2) \text{ kW/cm}^2$ est l'intensité du laser d'excitation à l'entrée du microscope, et non l'intensité vue par les Bodipy FL. Il faut prendre en compte la valeur du facteur de transmission calculé en polarisation TM, en estimant qu'on se situe à proximité de l'angle critique. Cela représente un facteur

2,7 environ (incidence à 67° pour un angle critique à $65,5^\circ$) en amplitude au carré entre l'onde incidente et l'onde évanescente, soit environ 10 kW/cm^2 . On a toujours un facteur 4 entre notre valeur mesurée et la valeur théorique de I_{sat} . Ces chiffres sont à prendre avec précaution, car nous avons utilisé des chiffres qui ne sont pas ceux du Bodipy FL, et la valeur de I_{sat} prédite par l'ajustement est aussi sujette à critique, car nous n'avons pas un ajustement précis par manque de données à plus fortes intensités. De plus, les Bodipy FL blanchissent quand même dans ces conditions, donc notre valeur de I_{sat} est en fait l'intensité d'excitation nécessaire pour que les Bodipy FL émettent la moitié du nombre maximal de photons possibles avec une durée d'acquisition de 100 ms dans le système ROXS. Elle n'est donc pas absolue.

3.5 Conclusion.

Dans ce chapitre, nous avons déterminé l'intensité de saturation du Bodipy FL, en présence d'oxygène, et nous avons tenté de mesurer sa durée de vie dans ces conditions à l'intensité de saturation, mais celle-ci est trop petite pour notre résolution temporelle qui est de l'ordre de 20 ms. Nous avons alors essayé différentes voies pour améliorer la durée de vie du Bodipy FL. Nous avons remarqué que l'élimination de l'oxygène de la solution, avec un système oxydant-réducteur (ROXS) permet d'augmenter grandement la durée de vie du Bodipy FL (au moins un facteur 25 pour une intensité d'excitation 35% plus élevée avec le ROXS qu'en présence d'oxygène). Il serait utile aussi d'avoir une mesure de durée de vie maximale pour un rapport signal sur bruit minimal permettant l'observation du Bodipy FL. Des observations préliminaires permettent de prédire une durée de vie supérieure à la seconde dans le cas d'une intensité d'excitation moyenne de 400 W/cm^2 . Nous voulons aussi stabiliser complètement la fluorescence du Bodipy FL à plus forte intensité, cela en améliorant l'efficacité du ROXS. Des études complémentaires vont être effectuées pour trouver un réducteur efficace en remplacement de l'acide ascorbique. Cela serait important pour des expériences de FRET, mais pas pour nos projets actuels. Malgré ce problème persistant, on est maintenant capable de discriminer le photoblanchiment de plusieurs Bodipy FL présents au même point, grâce à l'amélioration de la durée de vie du Bodipy FL par rapport à la durée d'acquisition des images. Comme on le voit sur la Figure 3.24, on discrimine parfaitement trois Bodipy FL qui photoblanchissent successivement, le premier rapidement (500 ms environ), le deuxième beaucoup plus tard (quasiment 4 secondes) et le dernier à la fin du film (9 secondes environ).

Ce résultat est un pas décisif pour compter le nombre d'acides aminés lysines marqués Bodipy FL incorporés par le ribosome lors d'une expérience de traduction en molécule unique. Pour cela, il conviendra d'abord de vérifier la compatibilité du système ROXS avec l'activité traductionnelle du ribosome.

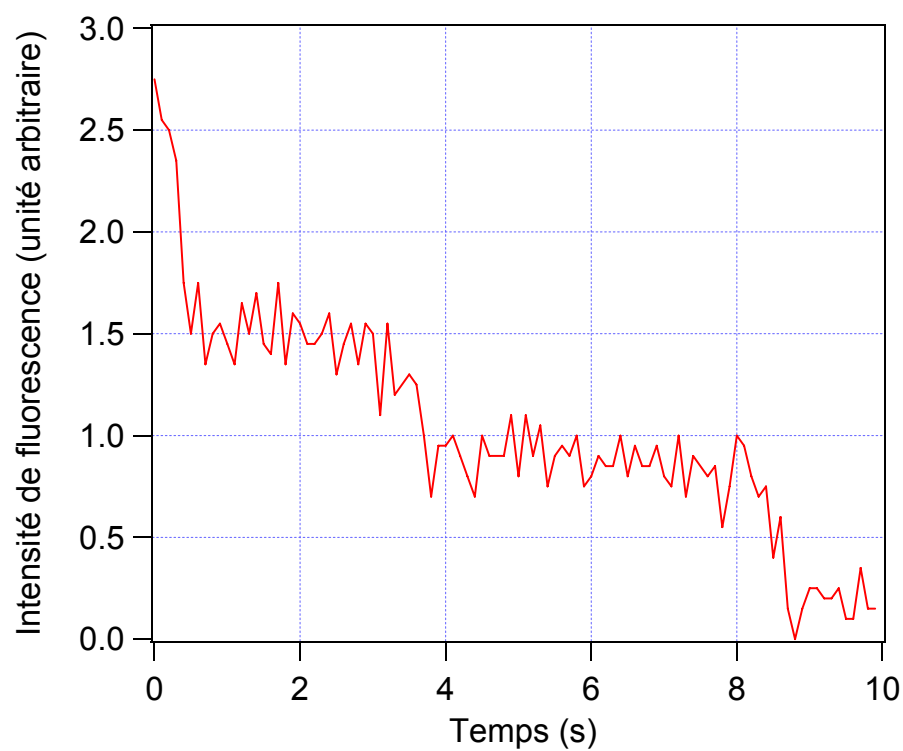


FIG. 3.24 – *Photoblanchiments successifs de trois Bodipy FL situés en un même point avec ROXS. Film de 100 images avec une durée d'acquisition de 100 ms par image. Intensité du faisceau incident 400 W/cm^2 @ 488 nm .*

Chapitre 4

Fonctionnalisation de surface et cellule microfluidique.

La microscopie de fluorescence par onde évanescente impose de travailler à proximité de la surface où est créée l'onde évanescente, ici la lamelle de verre. Une attention toute particulière est donc portée à la chimie de surface, et à la fonctionnalisation ensuite, pour plusieurs raisons. Il est nécessaire que la nature de la surface n'entrave pas le fonctionnement de l'objet biologique étudié. Pour cela, on doit accrocher le système par des sites spécifiques. Cela implique l'utilisation d'une surface ayant le moins d'interactions possible avec les différentes espèces présentes dans l'échantillon. Les interactions sont de nature électrostatique. Il convient donc de s'en prémunir en utilisant des surfaces neutres électrostatiquement car les espèces présentes ici ont des charges différentes. Les oligonucléotides ont un squelette phosphaté qui leur donne une charge négative. Par contre, les protéines peuvent être neutres ou chargées positivement ou négativement suivant leur repliement.

Nous avons testé deux fonctionnalisations de surface différentes. La première, très utilisée avec les oligonucléotides, fait appel à la BSA (albumine de sérum bovin), qui se fixe de manière directe à la surface de verre, sans préparation préalable. La seconde, utilisée plus particulièrement avec des protéines, est basée sur un polymère, le PEG (polyéthylène glycol). Celui-ci ne s'accrochant pas naturellement au verre, une chimie de surface est nécessaire.

Dans ce chapitre, nous allons décrire ces différentes méthodes, depuis la préparation des lamelles de verre jusqu'aux tests finaux avec des oligonucléotides ou des ribosomes. Ce chapitre sera plutôt technique, nous allons nous attacher à décrire les étapes de fonctionnalisation de surface, ainsi que les tests de qualité de ces surfaces. Cette étape est essentielle pour toute expérience en molécule unique à proximité d'une surface. Sans ce socle, toutes les expériences présentées dans cette thèse n'auraient pas été possibles. L'élaboration de ces divers protocoles a demandé beaucoup d'essais avant de parvenir à un résultat acceptable et reproductible en général.

Nous avons réalisé deux batteries de tests, une avec des échantillons scellés et une autre avec des cellules microfluidiques. Avec les échantillons scellés, nous préparons l'échantillon au préalable et nous le scellons au final pour l'observation. Une fois fermé, nous ne pouvons plus agir dessus. Dans le cas de la cellule microfluidique, l'échantillon est réalisé dans la cellule, nous avons donc accès à l'échantillon à n'importe quel moment en injectant les réactifs voulus. Nous pouvons ainsi suivre chaque étape sur le microscope et agir en conséquence. Nous détaillerons l'élaboration des cellules microfluidiques utilisées pour nos expériences portant sur le ribosome. Elles présentent trois avantages. Le premier est de pouvoir faire différents tests sur la même surface, car l'échantillon n'est pas scellé définitivement. Le second est de limiter la quantité de réactif à injecter, de part le

faible volume utilisé dans ce système microfluidique. Le troisième, important pour nos expériences, est de pouvoir synchroniser l'injection des réactifs nécessaires à la traduction avec l'acquisition des données, pour déterminer la cinétique de traduction.

4.1 Nettoyage des lamelles de microscope.

Cette étape est tout autant primordiale que celles qui suivent, car sans une surface de grande qualité, c'est-à-dire propre à l'échelle moléculaire, il est impossible d'avoir une chimie de surface optimale. Malheureusement, les lamelles achetées dans le commerce ne sont pas directement prêtes à l'emploi. Elles nécessitent une ou plusieurs étapes de nettoyage.

Nous utilisons des lamelles faiblement fluorescentes de deux formats. Le premier format, 25×25 mm (réf. 12-542C, Fisherbrand), est utilisé dans l'élaboration d'échantillons scellés par graisse de silicone (Dow Corning, high vacuum grease, Fisher Bioblock) à une lame de microscope. Le second format, 24×65 mm (Deckgläser, Menzel-Gläser), est utilisé dans la confection de cellules microfluidiques.

Ces deux types de lamelles subissent les mêmes traitements. Elles sont placées d'abord dans un bécher d'acétone pure (pureté $> 99\%$), qui est mis dans une cuve à ultra-sons, réglée dans le mode "sweep", c'est-à-dire nettoyage, pendant dix minutes à pleine puissance. Cela a pour effet d'enlever toutes poussières et traces de corps gras. Ensuite, on rince les lamelles, d'abord dans le bécher, puis une par une, à l'eau ultra-pure obtenue d'un polisseur d'eau. Puis elles sont placées à sécher sous un flux laminaire classe 100.

Les surfaces de ces lamelles sont maintenant dépourvues de dépôts, mais elles ne sont pas suffisamment propres pour des études à l'échelle de la molécule unique. Il reste encore des résidus fluorescents. Pour les éliminer, on place les lamelles dans la chambre d'un nettoyeur plasma (Femto, cuve en borosilicate, Dieter) où elles subissent un plasma d'oxygène ($P_{O_2} = 0,4$ millibar) pendant trois minutes. On peut maintenant les stocker dans des Falcons de 50 ml, scellés avec du Parafilm, afin de les utiliser ultérieurement pour nos études. Le délai d'utilisation ne doit pas excéder une semaine à dix jours, autrement il importe de refaire l'étape au nettoyeur plasma.

4.2 Fonctionnalisation type BSA.

Cette technique, couramment utilisée car simple, est la première que nous avons mise en place. Sur des lamelles nettoyées, on applique le protocole suivant :

1. Sur du Parafilm, on dépose $50\ \mu\text{l}$ de BSA-biotinylée (Sigma Aldrich), dissoute à 1 g/l dans un tampon TRIS (100 mM) salé (250 mM de NaCl), appelé par la suite tampon A. Sur cette goutte est disposée une lamelle, puis on laisse incuber pendant cinq minutes. La BSA-biotine va ainsi se fixer de manière non spécifique sur la surface de verre. On rince ensuite abondamment la lamelle avec le tampon A.
2. Sur un autre morceau de Parafilm, on dépose $50\ \mu\text{l}$ de streptavidine (Invitrogen, Molecular Probes) dissoute à 0,2 g/l dans le tampon A. On place la surface traitée à la BSA-biotine de la lamelle sur cette goutte pendant cinq minutes. La streptavidine va se fixer à une biotine de la BSA. On rince ensuite abondamment la lamelle avec le tampon A.
3. On peut maintenant fixer sur cette surface les espèces biologiques à étudier, en les accrochant spécifiquement à la streptavidine, par l'intermédiaire d'une biotine.

Cette fonctionnalisation est valable avec des systèmes nucléotidiques. Mais la BSA ayant une charge négative à un pH de 7,5 (point isoélectrique : 4,6), son utilisation devient difficile avec des éléments chargés positivement, comme cela est le cas avec certaines protéines. Le ribosome étant constitué en partie de protéines, il a une tendance à se fixer non spécifiquement à la surface BSA-biotine. Ce point nous a obligé à étudier une autre fonctionnalisation à base de polymère, le polyéthylène glycol (PEG).

4.3 Fonctionnalisation type PEG.

Nous nous sommes inspirés des travaux en microscopie de fluorescence de molécule unique sur des protéines [52] ou sur le ribosome [17], où les auteurs utilisent des surfaces PEGylées. La particularité du PEG (polyéthylène glycol) est d'être électrostatiquement neutre, et donc, d'interagir faiblement avec son environnement. Cela en fait un bon candidat pour l'étude de systèmes complexes à proximité d'une surface, comprenant polypeptides et nucléotides. Son utilisation est plus complexe que celle de la BSA. Le PEG ne s'accrochant pas naturellement au verre, il est nécessaire de passer par une étape intermédiaire de chimie pour le fixer à la surface. Le PEG utilisé ici comporte une terminaison NHS, lui permettant de réagir à une amine. Il faut donc fixer une amine à la surface, ce qui sera décrit dans le paragraphe suivant, puis nous décrirons le protocole de fixation du PEG à la surface.

4.3.1 Chimie de surface préalable.

L'étape de chimie intermédiaire consiste à fixer un amino-silane, le 3-(aminopropyl) triethoxysilane (APTES), à la surface. Le triethoxysilane réagit avec la silice de la lamelle de verre pour créer des liaisons covalentes. A partir de cette couche, nous allons construire notre fonctionnalisation.

Le protocole de silanisation de la surface est le suivant :

1. On utilise des lamelles fraîchement nettoyées, mais elles nécessitent un jour de repos après le passage au nettoyeur plasma, car celui-ci peut modifier la charge de la surface, et donc créer des artefacts lors de la silanisation. De plus, la graisse de silicone adhère difficilement aux lamelles fraîchement préparées. On place ces lamelles dans un bain d'acide chlorhydrique (HCl) à une concentration de 6 M¹ pendant une heure. Cela a pour but d'activer chimiquement les surfaces. On rince ensuite abondamment à l'eau ultra-pure, puis on laisse sécher à l'air.
2. On immerge ensuite les lamelles dans de l'APTES (pureté > 99%, Sigma Aldrich) en solution avec de l'acétone (acétone chromasolv, pureté > 99,8%, Sigma Aldrich) (2 % en V/V)² pendant 1 heure. On rince avec de l'acétone, puis abondamment à l'eau ultra-pure. Les lamelles séchent à l'air dans une étuve à 70°C.
3. **Etape facultative** : On pratique ensuite un "recuit" de la surface des lamelles en les mettant dans l'étuve à 100°C pendant seize heures. L'objectif de ce recuit est de former des liaisons entre les groupements éthoxy des silanes toujours libres après la réaction avec les SiO₂ de la lamelle. Ainsi, la surface est stabilisée et il n'y a plus la possibilité de formation d'agrégats entre amino-silanes [53].

Remarques :

¹M : mole/litre

²Volume/Volume

- Dans l'étape 2, on utilise de l'acétone pour diluer l'aminosilane et rincer la lamelle. Cela peut aussi se faire avec un autre solvant. On a travaillé dans un premier temps avec du dichlorométhane (CH_2Cl_2). Nous l'avons abandonné au profit de l'acétone, car étant très volatile, il laissait une couche blanche en séchant, qui ne partait pas à l'eau. Cela augmentait considérablement le fond de fluorescence, ce qui était rédhibitoire avec le Bodipy FL.
- Dans l'étape 3, dite facultative, il est important de ne pas "recuire" la surface si on veut observer du Bodipy FL ou du Cy3. En effet, le recuit a pour inconvénient de rendre la surface fluorescente dans le spectre d'émission du Bodipy FL, cela avec un fort signal. Il est à noter que l'APTES, comme d'autres aminosilanes, est utilisé pour rendre fluorescentes des billes de silice micrométriques après recuit [54].
- Il va de soi que l'environnement doit être extrêmement propre. Le matériel utilisé est en verre, et est nettoyé soigneusement à chaque utilisation, pour éviter toute pollution des surfaces. Les lamelles sont placées dans une cuve fabriquée sur mesure (Mondiaquartz, Grenoble) utilisée uniquement pour l'étape de silanisation.
- Les surfaces traitées ne doivent pas entrer en contact avec un autre matériau ou produit jusqu'à utilisation, afin d'éviter une pollution fluorescente. Les résultats sont meilleurs avec des lamelles préparées la veille, si l'étape de recuit n'est pas faite.

4.3.2 Fixation du PEG à la surface.

Dans ce paragraphe, nous allons présenter la partie finale du protocole d'élaboration d'une surface PEG après silanisation. Deux types de PEG sont utilisés ici. On mélange du PEG-biotine (Biotin-PEG-succinimidylcarbonate, MW³ 5000 Daltons, Laysan Bio, Fig.4.1) et du PEG simple (methyl-PEG-Sglutarate, MW 5000 Daltons, Laysan Bio, Fig.4.2), ces deux types ayant une fonction succinimidyl à une extrémité pour les fixer à la surface terminée amine. Cette fonction succinimidyl est très réactive et facilement hydrolysable. Elle a une durée de vie de 20 minutes dans l'eau avant hydrolyse. Les PEG sont conditionnés sous forme de poudre. Tout le protocole qui suit s'effectue dans une

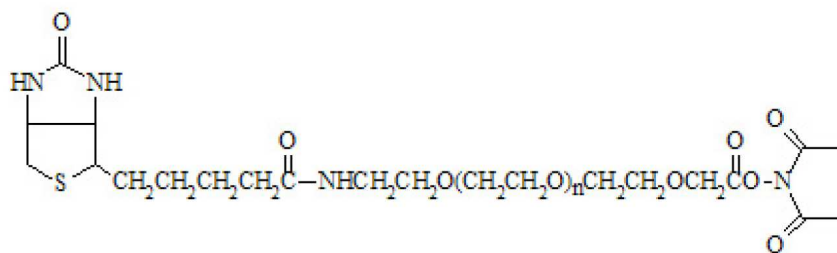


FIG. 4.1 – Formule chimique du PEG-biotine terminé NHS (*N*-hydroxysuccinimide) pour le fixer à la surface.

boîte à gants sous argon ou sous azote, même si cela est facultatif si le PEG est rapidement utilisé après ouverture du tube.

1. On commence par préparer les solutions de PEG. Pour cela, on dissout 1,25/12,5% (masse/volume) de PEG-biotine et PEG, respectivement, dans une solution de bicarbonate de sodium NaHCO_3 (100 mM) à pH = 8,3, fraîchement préparée car elle n'est pas tamponnée. On effectue cette dissolution juste avant de déposer le PEG sur les lamelles, car la fonction succinimidyl s'hydrolyse rapidement. Attention, le pH de la solution de bicarbonate de sodium est très critique !

³Molecular Weight

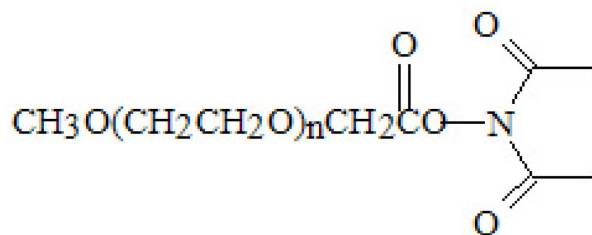


FIG. 4.2 – Formule chimique du PEG sans biotine terminé NHS (N-hydroxysuccinimide) pour le fixer à la surface.

2. La dissolution effectuée, nous déposons une goutte de 50 μl de la solution de PEG sur du Parafilm. On met ensuite une lamelle silanisée fraîchement sur cette goutte. L'incubation dure quatre heures.
3. L'incubation terminée, nous rinçons les lamelles une première fois avec la solution de bicarbonate de sodium, puis une seconde fois avec le tampon A pour éliminer le PEG n'ayant pas réagi. Nous déposons 50 μl de streptavidine (0,2 g/l dans du tampon A) sur un morceau de Parafilm, puis on y place une lamelle rincée. On laisse incuber environ trente minutes. La quantité de molécules uniques fluorescentes sur la surface sera directement proportionnelle à cette durée d'incubation. Au delà de trente minutes, on n'observe plus de différence, à concentration égale de l'espèce à fixer à la surface. Il semble que la proportion de biotine présente sur la surface est plus importante avec la BSA-biotine qu'avec le mélange de PEG/PEG-biotine.
4. On rince abondamment les lamelles avec le tampon A. On peut maintenant y fixer un système biologique par l'intermédiaire d'une biotine.

Condition de conservation et d'utilisation du PEG.

Dès leur réception, les PEG sont aliquotés sous argon ou sous azote, avec des quantités correspondant à une journée d'expérience, puis mis au congélateur à -80°C . Cela permet d'éviter de décongeler tout le stock de PEG à chaque expérience. Lors d'une expérience, il faut attendre environ quinze minutes à température ambiante que l'aliquot de PEG décongele avant d'ouvrir le contenant, pour éviter que de l'eau condense sur les parois du microtube. Dès que la dilution dans la solution de bicarbonate de sodium est effectuée, il faut rapidement mettre les surfaces à PEGyler en contact avec le PEG, pour éviter toute hydrolyse prématurée.

4.4 Exemples d'études comparatives en molécules uniques fluorescentes sur surfaces BSA et PEG

4.4.1 Interactions avec une surface BSA.

Nous allons tester le caractère spécifique de l'interaction entre la BSA-biotine et des systèmes polynucléotidiques. Pour cela, nous utilisons des oligonucléotides (monobrin d'ADN courts) marqués avec un fluorophore, le Cy5. Le procédé de traitement d'images, qui est détaillé dans le Chapitre 3, permet de discriminer les fluorophores uniques d'autres types de signaux parasites. Ici, on s'intéresse plus particulièrement à l'aspect *interaction avec la surface* des éléments biologiques. Ces oligonucléotides comportent ou non une biotine leur permettant de se fixer à la surface. Nous plaçons sur une surface de Parafilm 50 μ l d'oligonucléotides marqués Cy5 (MWG Biotech AG), comportant une biotine

(échantillon test) ou non (échantillon témoin), à une concentration de 50 à 100 pM (dilution dans tampon A). Les résultats obtenus sont très bons (Figure 4.3), l'interaction

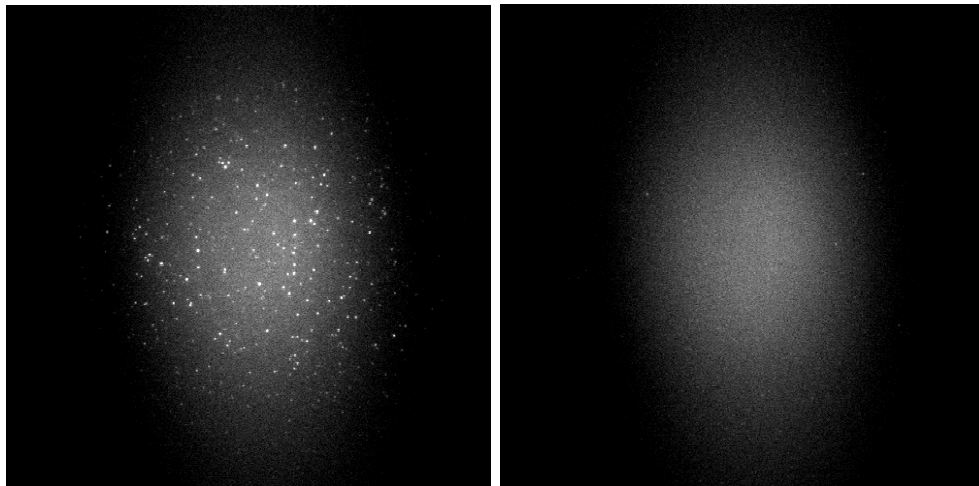


FIG. 4.3 – Images d'oligonucléotides marqués Cy5, biotinylés à gauche et non biotinylés à droite, sur une surface fonctionnalisée BSA-biotine. P à $632,8 \text{ nm} = 17 \text{ mW}$ à l'entrée du microscope. Temps d'exposition : 100 ms. Niveaux de gris identiques sur les deux images.

des oligonucléotides avec une surface BSA-biotine est purement spécifique. Par contre, des tests pratiqués avec des ribosomes marqués avec des nanocristaux semi-conducteurs (QD) nous ont donnés des résultats peu satisfaisants, c'est-à-dire une forte interaction non spécifique des ribosomes ou des QDs avec la surface. Des tests similaires ont été effectués en marquant les lysines⁴ accessibles sur les ribosomes avec des Cy5-NHS et ont abouti aux mêmes conclusions. On peut conclure qu'une surface BSA-biotine n'est pas adaptée à l'étude du ribosome et que l'interaction non spécifique ne provient pas que des QDs. La complexité du ribosome, constitué à la fois de diverses protéines et d'ARN ribosomal, empêche l'utilisation d'une surface type BSA. Etant chargée négativement, elle interagira forcément avec des régions des protéines des ribosomes, chargées positivement. De plus, on complexifie ce problème en marquant le ribosome avec un QD, qui introduit lui aussi des interactions. Nous allons maintenant voir ce qu'il en est avec une surface PEG.

4.4.2 Interaction avec une surface PEG/PEG-biotine.

On effectue les mêmes tests que sur la surface BSA. Pour le test avec les oligonucléotides, voici la suite des étapes d'élaboration de l'échantillon :

1. Après l'étape streptavidine, et avoir rincé abondamment la lamelle avec le tampon A, on dépose une goutte de $50 \mu\text{l}$ de solution d'oligonucléotides marqués Cy5 de concentration 1 nM, avec biotine dans le cas de l'échantillon test, et sans pour l'échantillon témoin. La concentration en oligonucléotides est plus élevée qu'avec la BSA, car le nombre de sites d'accroche est moindre. L'incubation dure dix minutes.
2. On rince abondamment, toujours avec le tampon A, puis on scelle l'échantillon.

Les résultats sont aussi bons qu'avec la BSA, les échantillons sont uniformes et homogènes. On n'observe pas de molécules fluorescentes fixées de façon non spécifique. L'échantillon témoin, avec des oligonucléotides sans biotine marqués Cy5, ne présente pas de molécules uniques, alors que le test (avec biotine) comporte une centaine de molécules uniques (Figure 4.4).

⁴La lysine a deux fonctions amines, une pour la liaison à l'ARNt et une libre. Cette fonction amine réagira avec la fonction NHS.

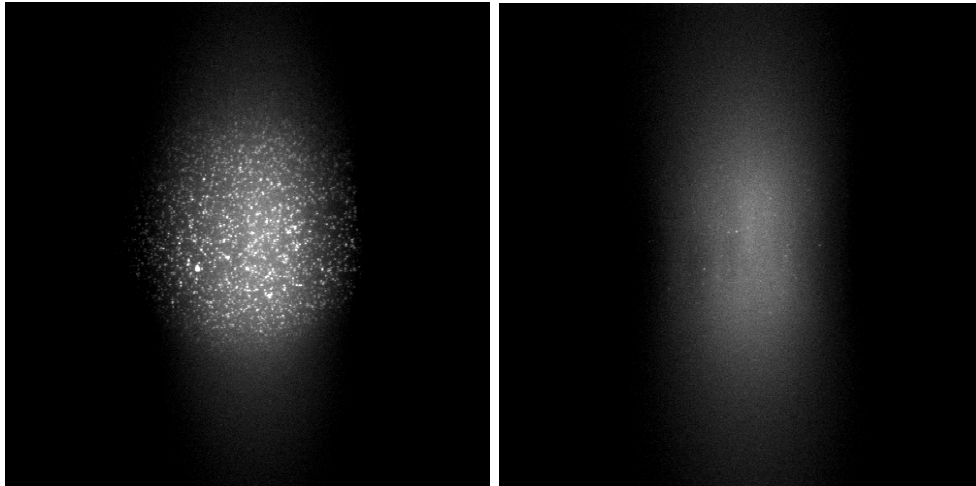


FIG. 4.4 – Image en microscopie TIRF d’une surface fonctionnalisée PEG-biotine-streptavidine, incubée avec des oligonucléotides marqués Cy5, sans biotine (droite) et avec (gauche). Puissance laser à 638 nm à l’entrée du microscope : 17mW. Durée d’exposition : 100ms. Niveaux de gris identiques sur les deux images.

4.4.3 Préparation des ribosomes marqués QD en vue d’une accroche sur une surface PEG.

Ce travail est présenté en deux étapes : tout d’abord, la préparation du complexe ribosome-ARN messager étudié, puis la fixation de ce complexe à la surface et son observation en molécule unique.

Elaboration du complexe ribosome/ARN messager

L’élaboration du complexe ribosome/ARNm est décrit dans le Chapitre 5 et dans les Annexes B et A. Nous utilisons ici des ribosomes modifiés pour être marqués spécifiquement avec des QD fonctionnalisés anti-GST (Qdot® 655 goat anti-glutathione-S-transferase conjugate, Invitrogen, Molecular Probes), qu’on excite à 638 nm ou à 632,8 nm (diode laser ou laser He-Ne respectivement). La fluorescence émise se situe à 655 nm.

Nous utilisons deux types d’ARNm. Les premiers sont biotinylés en 3’ (fin de l’ARNm) à l’aide d’un protocole détaillé dans le Chapitre 5. Les seconds ont une séquence en 5’ complémentaire d’un oligonucléotide d’ADN biotinylé, correspondant à une séquence du gène 32 de *E. Coli*. Nous hybridons ces deux brins pour fixer le ribosome via l’ARNm à la surface. Nous pouvons complexer les ribosomes marqués QD aux ARN messagers. Le tampon utilisé ici, appelé ensuite tampon R, est décrit dans les expériences de Scott Blanchard *et al.*[17, 18]. Il se compose de :

- Tris HCl pH 7,5 50mM (1,25ml d’un stock à 2M) ;
- KCl 100mM (2,5ml de 2M) ;
- NH₄Cl 5mM (62,5μl de 4M) ;
- CaCl₂ 0,5mM (25μl de 1M) ;
- MgOAc 10mM (500μl de 1M) ;
- β-mercapto-Ethanol (BME) 6mM (21μl de 14,3M stocké sous hotte). A ajouter juste avant l’expérience.
- Ajuster à 50ml avec de l’eau milliQ directement dans le falcon.

4.4.4 Validation de la surface PEG avec des ribosomes marqués par QD.

Dans cette expérience, on fixe le système biologique étudié à la surface PEG précédemment décrite, comme cela est représenté sur la Figure 4.5.

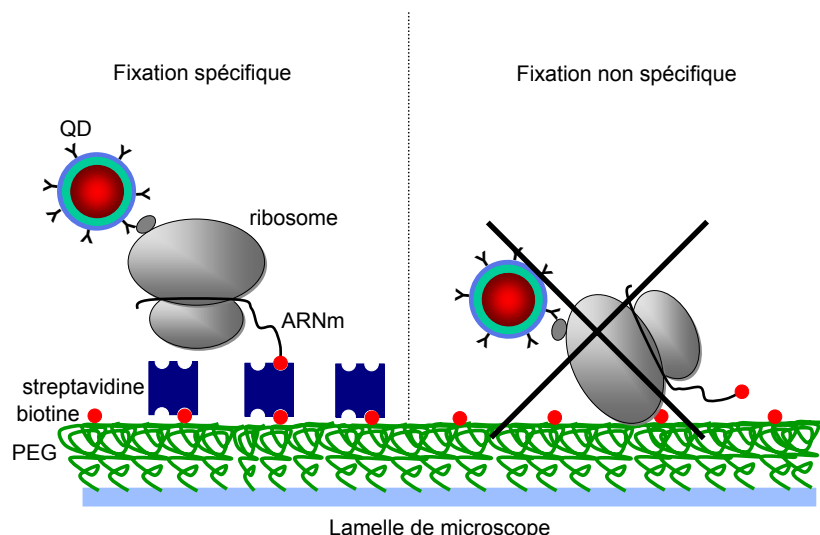


FIG. 4.5 – Schéma des expériences de spécificité des ribosomes marqués QD sur une surface PEG. À gauche, on a l'accroche d'un ribosome par l'ARNm biotinylé à la surface PEG via une streptavidine. À droite, on a le cas non spécifique, où le ribosome vient se déposer sur la surface sans streptavidine, sans partir après rinçage.

L'objectif est d'avoir le minimum de ribosomes accrochés de manière non spécifique à la surface PEG, c'est-à-dire autrement que par la biotine fixée sur l'ARNm directement ou par le complexe ARNm/ADN-biotine. Plusieurs essais ont été effectués, sans et avec agents passivants (espèces chimiques ou biologiques qui empêchent les interactions non spécifiques entre la surface et le système étudié).

Etude du comportement de la surface PEG avec des ribosomes marqués QD et des QD seuls.

Trois échantillons sont préparés :

1. L'échantillon 1 comporte tous les composants nécessaires à l'accroche à la surface, c'est à dire le complexe ribosome-QD + ARNm hybridé à un oligonucléotide biotinylé.
2. L'échantillon 2 n'a pas d'ADN biotinylé, pour observer les interactions non spécifiques des ribosomes marqués avec la surface PEG.
3. L'échantillon 3 contient juste des QD déposés sur la surface PEG, afin de mettre en évidence leur interaction éventuelle avec cette surface.

On incube les lamelles, fonctionnalisées avec du PEG, en les déposant sur une goutte de 50 μl de solution contenant 1 nM de complexes ribosomes marqués QD/ARNm-biotine. En ce qui concerne l'échantillon témoin, la préparation des ribosomes est légèrement modifiée : les oligonucléotides d'ADN biotinylés ne sont pas hybridés à l'ARNm. La concentration reste la même. Pour l'expérience avec des QD uniquement, on utilise aussi le tampon R.

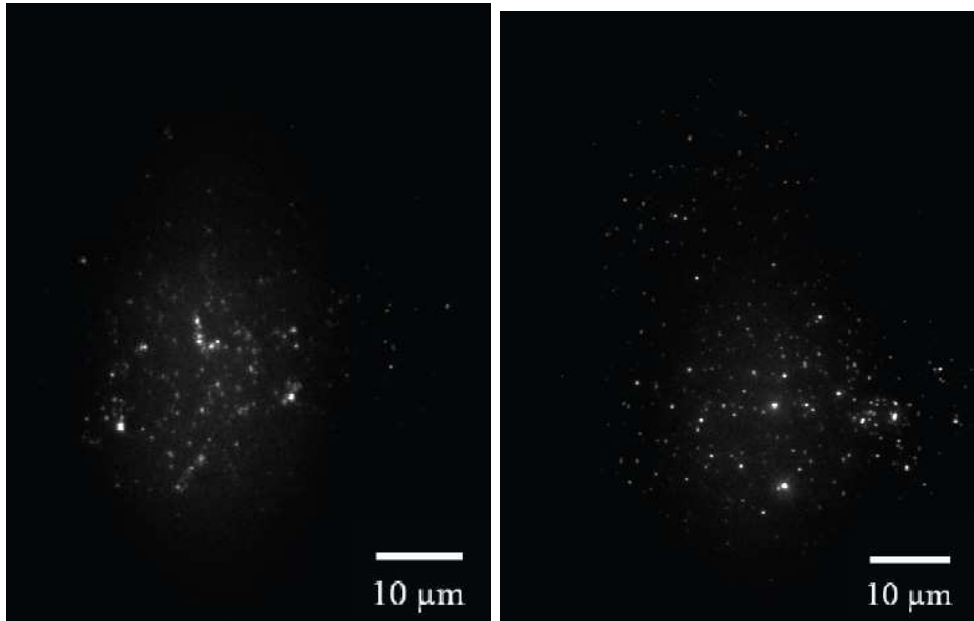


FIG. 4.6 – Image en microscopie TIRF de QD marquant chacun un ribosome complexé à un ARNm. Sur l'image de droite, l'ARNm n'est pas hybridé à un oligonucléotide biotinylé. Pour l'image de gauche, il est hybridé à un oligonucléotide d'ADN biotinylé. P à l'entrée du microscope = 17 mW @ 638 nm. Durée d'exposition : 100ms. Aucune passivation dans les deux cas. Même niveau de gris sur les deux images.

Il n'y a pas de différence notable entre l'échantillon test et l'échantillon témoin (Figure 4.6). Les ribosomes, ou les QD, ont tendance à se fixer de manière non spécifique à la surface. Pour savoir si les deux espèces posent problème lors de la confection de l'échantillon, on va d'abord observer les QD sur une surface PEG, avec et sans passivation.



FIG. 4.7 – QD (concentration : 1 nM) imagés en microscopie TIRF. P à 638 nm = 17 mW à l'entrée du microscope. Durée d'excitation : 100ms. Aucune passivation à gauche et passivation au Blocking Reagent (Roche) à droite. Niveaux de gris identiques dans chacune des images.

Les QD interagissent peu avec la surface PEG. La Figure 4.7 montre qu'il n'y a pas de différence notable entre le témoin, qui est sans passivation, et le test, avec une passivation au Blocking Reagent (Roche), un agent (essentiellement de la caséine) utilisé pour protéger

les surfaces des interactions non spécifiques avec les QD [55]. Donc, le problème viendrait des ribosomes. Il est nécessaire de trouver une passivation efficace dans notre situation. Elle ne doit pas interagir avec les QD, tout en passivant la surface pour les ribosomes.

Différentes solutions passivantes pour les ribosomes sur le banc d'essai.

Deux protocoles ont été testés. Le premier est le protocole de Scott Blanchard *et al.*[17], utilisant une solution passivante avec 10 μM de BSA et 10 μM d'ADN double brin (15 bases) incubée vingt minutes sur la surface, avant l'introduction des ribosomes-QD. Les tests pratiqués avec ce protocole n'ont pas résolu le problème des interactions non spécifiques des ribosomes avec la surface PEG.

Le second protocole vient d'un article de l'équipe de Pierre Desbiolles [55], basé sur le Blocking Reagent (Roche). On l'a utilisé dans l'expérience sur les interactions entre les QD et la surface PEG vu ci-dessus. Cet agent est habituellement utilisé dans des expériences d'hybridation d'oligonucléotides pour éviter que ceux-ci ne se fixent aléatoirement sur les surfaces. On a utilisé le protocole tel que décrit dans l'article, à l'exception près du tampon. Nous avons utilisé le tampon R il est indispensable au ribosome pour rester actif. Voici le protocole de mise en place de cet agent passivant.

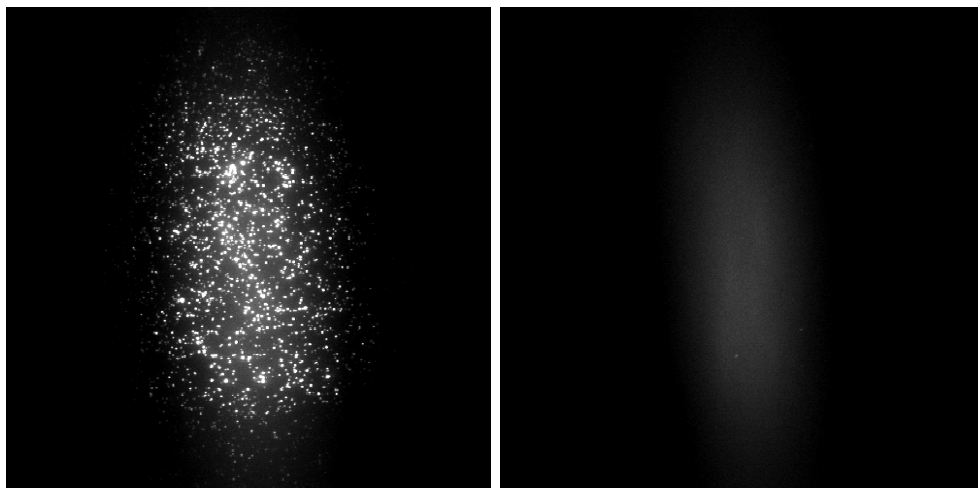


FIG. 4.8 – Image en microscopie TIRF de la fluorescence des QDs marquant les ribosomes, en solution passivante, fixés à la surface PEG, elle-même passivée. P à 638 nm = 17 mW. Durée d'exposition : 100ms. Les ribosomes sont associés chacun à un ARNm biotinylé. On a mis de la streptavidine dans l'échantillon de gauche, et pas pour celui de droite. Concentration en ribosome : 1 nM. Niveaux de gris identiques dans chacune des images.

On dissout 10 mg de Blocking Reagent dans 1 ml d'acide maléique (tampon) à 100 mM, contenant 150 mM de NaCl. Le pH du tampon est ajusté à 7,5 à 20°C. Pour dissoudre le Blocking Reagent, on met l'aliquot pendant 1h à 37°C dans un bloc chauffant. Le tampon doit être conservé à -20°C pour ne pas changer le pH de la solution. Une fois dissout, on place l'aliquot à 4°C. Cette solution servira à traiter la surface PEG entre l'étape streptavidine et ribosome. On laissera incubé au moins trente minutes cette solution avec la surface.

On dissout 0,3 g/l de Blocking Reagent dans le tampon R, contenant déjà les ribosomes-QDs. Il est nécessaire que les ribosomes marqués soient en présence de l'agent bloquant pendant au moins une heure pour que la passivation ait lieu. Puis, on dépose cette solution sur les lamelles passivées (dix minutes d'incubation), afin de fixer les ribosomes

à la surface par l'intermédiaire de l'oligonucléotide d'ADN biotinylé, ou de la biotine de l'ARNm.

A la fin de chaque étape, on rince abondamment avec le tampon R, afin d'éliminer le Blocking Reagent en excès. L'observation de ribosomes-QD sur une surface PEG démontre que la passivation élimine la majeure partie des interactions non-spécifiques à la surface (Figure 4.8). Ce système est maintenant utilisable dans le cadre d'une étude en molécule unique fluorescente de la synthèse d'une protéine à proximité d'une surface. C'est cette étude qui sera menée dans le chapitre suivant. Nous allons maintenant présenter l'élaboration de notre système microfluidique, appliqué à notre étude. Nous allons aussi montrer que nous avons la même qualité de surface avec ce système qu'avec des cellules scellées avec de la graisse de silicone.

4.5 Conception d'une cellule microfluidique adaptée à notre étude.

Beaucoup de systèmes microfluidiques ont été développés dans le cadre d'études portant sur les interactions entre acides nucléiques et protéines [56]. Notre expérience peut s'en inspirer, mais à condition de répondre à certains critères que nous allons détailler.

4.5.1 Considérations préalables à la fabrication.

Notre cellule microfluidique doit répondre aux critères suivants :

- Elle doit comporter un nombre limité de matériaux différents pour éviter les interactions non spécifiques.
- Elle doit être simple d'utilisation pour faciliter les manipulations au cours de l'expérience et ainsi ménager au maximum le système biologique.
- La chimie de surface est effectuée pour chaque échantillon à partir d'une lamelle extrêmement propre. La cellule doit donc être conçue pour être démontée et réassemblée à chaque expérience. Idéalement, seule la lamelle de microscope sera changée et le reste du montage sera réutilisable.
- La partie réutilisable de la cellule doit être robuste car elle sera nettoyée à chaque nouvelle utilisation par des moyens agressifs (plasma d'oxygène). Elle doit aussi être adaptée à l'utilisation de solvants tels que l'acétone et l'acide chlorhydrique concentré. Ces étapes de nettoyage sont indispensables pour éliminer toute trace de RNAses. Ces protéines sont en effet présentes partout dans notre environnement et ont pour fonction de dégrader les ARN qu'elles rencontrent. Elles sont donc très préjudiciables à nos expériences.
- Au moins une de la cellule faces doit être de qualité optique (une lamelle de microscope) pour l'excitation laser et l'observation en microscopie de fluorescence. Idéalement, la cellule doit comprendre 2 accès optiques sur ses faces supérieure et inférieure. Nous souhaitons en effet à terme coupler la microscopie de fluorescence à une pince optique. Pour effectuer des mesures précises de forces, il faut pouvoir collecter en transmission le faisceau de piégeage, qui est fortement focalisé dans l'échantillon avec l'objectif de microscope. En résumé, d'un côté, nous utilisons un objectif de microscope à grande ouverture numérique pour la microscopie TIRF et pour le piégeage optique. Il est bien corrigé des aberrations uniquement si il est associé à une lamelle de microscope d'épaisseur 0,17 mm d'épaisseur. Ceci impose la face inférieure de la cellule. Ensuite, pour la détection en transmission du faisceau de piégeage, nous utilisons un condenseur à immersion de grande ouverture numérique, corrigé des aberrations pour une utilisation avec une lame de microscope d'épaisseur 1 mm. Ce sera donc la face supérieure de la cellule.

Ces contraintes rendent compliquée l'utilisation d'une cellule élaborée en lithographie douce, avec des microcanaux dessinés dans du PDMS (polydiméthylsiloxane, polymère couramment utilisé pour réaliser des systèmes microfluidiques). Nous avons donc préféré opter pour un système comprenant une lame et une lamelle de microscope scellées l'une à l'autre par du Parafilm ou du scotch double-face.

4.5.2 Description de la cellule microfluidique.

Cette cellule est composée d'une lame de microscope en verre BK7 (Fisher Scientific), percée de deux trous de 1 mm de diamètre espacés de 50 mm⁵. Sur cette lame, nous avons fixé deux plots de PDMS d'environ 1 cm de diamètre, percés pour permettre l'injection et l'évacuation des produits par deux capillaires en PTFE de diamètres internes 0,3 mm (diamètres externes 0,76 mm). Cette lame constitue la base permanente de la cellule. Nous fixons la lamelle de microscope (silanisée au préalable) soit par du scotch double face, soit par du Parafilm. Pour cela on découpe la forme de cellule voulue avec une lame de rasoir, qu'on place entre la lame percée et la lamelle. Nous obtenons une cellule ayant un volume final de quelques microlitres, avec une grande surface de travail (environ 3 mm sur 45 mm pour une épaisseur d'environ 100 μm). On peut injecter un débit maximum de 5ml/minute d'eau milliQ à l'aide d'un pousse-seringue (PHD 2000, Harvard-Apparatus), avec de l'eau milliQ, sans avoir de fuite. En général, nous ne travaillons pas avec un débit supérieur à 1 ml/minute.

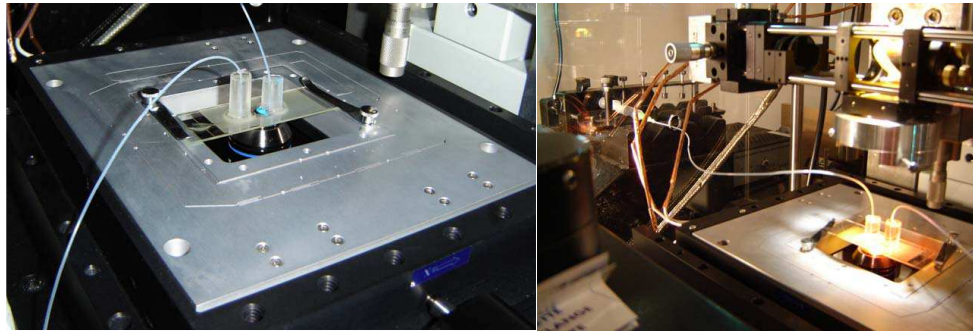


FIG. 4.9 – Photo du système microfluidique. L'image de droite est une vue d'ensemble de la cellule, posée sur la platine de microscope. On voit le pousse-seringue en arrière plan. Sur la photo de gauche, nous avons un agrandissement sur la cellule. On remarque le faisceau laser incident qui diffuse un peu au point de réflexion totale. Cette cellule a des trous espacés de 20 mm, pour limiter le volume d'injection. Elle est réservée à la microscopie de fluorescence.

Pour déterminer si l'écoulement dans la cellule se situe bien dans un régime de Stokes, c'est-à-dire si l'écoulement est laminaire, nous allons évaluer le nombre de Reynolds. Ce nombre sans unité décrit le caractère turbulent ou laminaire d'un écoulement. Pour une valeur supérieure à 2000, on considère l'écoulement comme turbulent, pour une valeur très inférieure à 1, on considère l'écoulement comme laminaire. Il est défini de la façon suivante :

$$Re = \frac{Ul}{\nu} \quad (4.1)$$

avec U la vitesse caractéristique, l la longueur caractéristique du système et ν la viscosité cinématique ($10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'eau).

⁵Le perçage a été réalisé à l'atelier d'optique du LCFIO.

Cette caractéristique est importante, car nous voulons avoir un rinçage efficace de notre cellule après chaque injection. Un rinçage en écoulement turbulent aurait pour effet de diluer le produit incubant au lieu de l'évacuer.

Notre cellule a pour dimensions caractéristiques 4 mm de largeur, 45 mm de longueur et 0,1 mm de hauteur. La longueur caractéristique est donc la hauteur. Si on considère les deux cas extrêmes de débit pour notre système, la vitesse de l'écoulement est de $0,04 \text{ m.s}^{-1}$ pour un débit de 1 ml/min et 1000 fois moins pour un débit de $1 \mu\text{l}/\text{min}$. Dans le premier cas, nous avons : $\text{Re} = 4.10^{-2}$ et dans le deuxième cas, nous avons $\text{Re} = 4.10^{-5}$. Dans tous les cas l'écoulement est laminaire, donc le rinçage sera bien efficace. Le profil de vitesse dans l'écoulement sera parabolique.

4.6 Evaluation de la spécificité des interactions dans la cellule microfluidique.

Comme nous devons réaliser nos expériences sur la traduction avec ces cellules microfluidiques, nous devons évaluer si nous avons la même qualité de surface qu'avec les échantillons scellés avec de la graisse de silicone.

4.6.1 Tests avec des oligonucléotides marqués Cy5.

Ici, nous avons des surfaces fonctionnalisées PEG/PEG-biotine. Nous allons injecter des oligonucléotides marqués Cy5, avec une biotine dans le cas du test, et sans biotine dans le cas du contrôle. Les concentrations et les durées d'incubation sont les mêmes que pour les lamelles scellées.

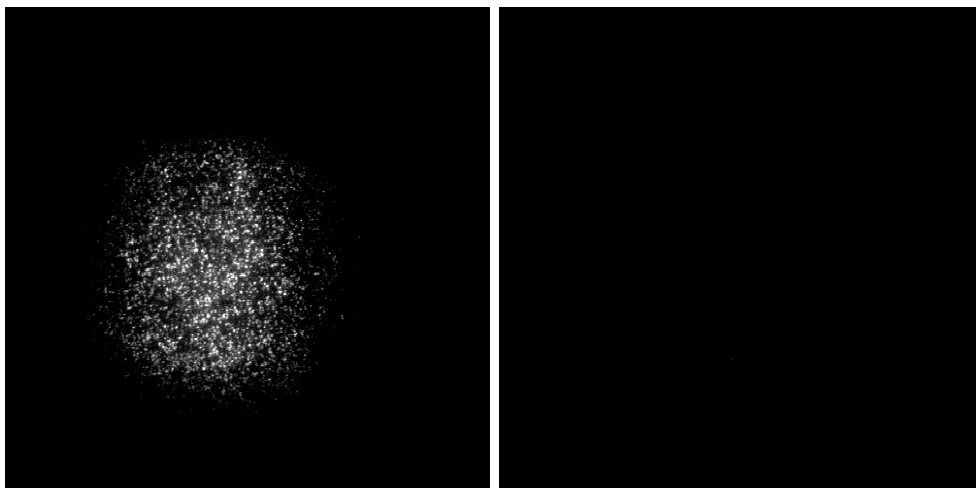


FIG. 4.10 – Image d'un échantillon en cellule microfluidique avec fonctionnalisation PEG-biotine-streptavidine. A gauche, image avec des oligonucléotides marqués Cy5 biotinylés, à droite image avec des oligonucléotides non biotinylés. $P = 17 \text{ mW}$ @ 638 nm à l'entrée du microscope.

Nous pouvons voir que nous avons d'excellentes surfaces avec les cellules microfluidiques, n'interagissant pas de façon non spécifique avec les oligonucléotides.

4.6.2 Tests avec des ribosomes marqués QD.

Les complexes ribosome-QDs sont concentrés à 2 nM, et incubés 10 minutes à la surface de l'échantillon, cela après les étapes décrites dans 4.4.4. La différence se situe au niveau de l'accroche du complexe à la surface. Ici, la biotine est directement fixée en 3' [16].

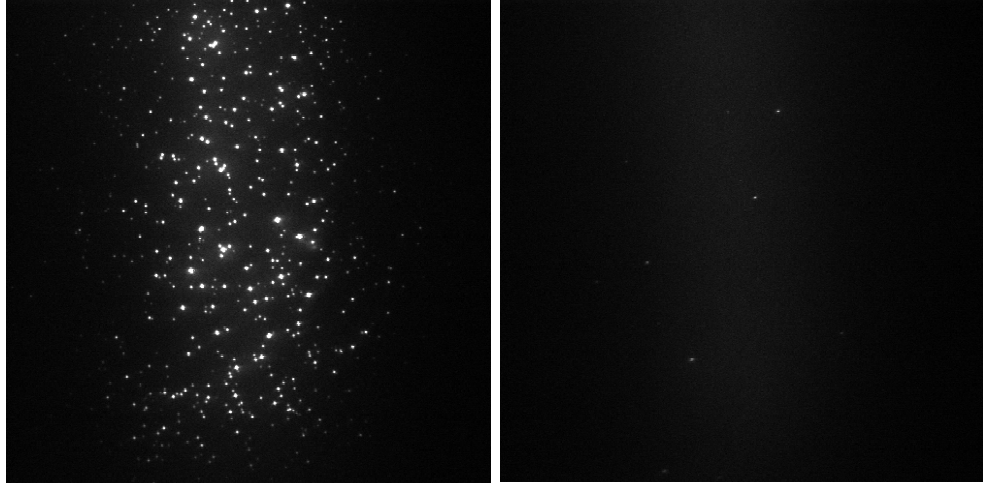


FIG. 4.11 – Test de spécificité de ribosomes marqués QD (émission à 655 nm) avec une surface PEG dans une cellule microfluidique. A gauche, les ribosomes marqués QD s'accrochent à la surface PEG-biotine-streptavidine via un ARNm biotinylé. A droite, le contrôle sans streptavidine sur la surface. $P = 17 \text{ mW}$ @ 638 nm à l'entrée du microscope.

Ici encore (Figure 4.11), nous remarquons que l'accroche des ribosomes via l'ARNm à la surface est spécifique. Elle ne se fait que par la streptavidine fixée à la surface. De plus, les ribosomes restent accrochés à la surface pendant une longue période de temps. Ceci signifie que nos échantillons ne contiennent aucun réactif biologique agressif vis-à-vis du ribosome ou de l'ARNm. Donc, on peut supposer qu'il n'y a pas ou peu de RNases dans nos échantillons.

4.7 Conclusion.

Dans ce chapitre, nous avons montré la qualité de notre chimie de surface. Ce travail a été essentiel pour envisager la réalisation de nos expériences biologiques *in vitro* et a nécessité beaucoup d'essais pour parvenir à un protocole donnant des résultats satisfaisants. Malheureusement, cette étape clé n'est toujours pas systématiquement reproductible. Nous avons remarqué que la qualité de notre silanisation pouvait évoluer d'un lot à l'autre, cela dans les mêmes conditions de réalisations. Nous avons même constaté que dans un même lot, la qualité des surfaces pouvait être drastiquement différente. Il n'existe pas, à notre connaissance, de moyen pour pouvoir avoir une qualité égale. Nous avons aussi vu que le recuit après silanisation améliorerait sensiblement la qualité de la surface, mais nous ne pouvons pas le réaliser pour les expériences avec le Bodipy FL à cause de l'augmentation du fond de fluorescence qui en découle. Il serait intéressant de travailler sur une chimie de surface différente, incluant un autre aminosilane, ayant les mêmes propriétés de chimie de surface que l'APTES, mais n'ayant pas de fluorescence dans le vert après recuit. Les PEG peuvent avoir aussi une qualité aléatoire en fonction du lot. Le prototype de cellule microfluidique utilisé actuellement est en cours d'amélioration.

Même si sa simplicité de fabrication et d'utilisation est un avantage, il présente l'inconvénient d'avoir un volume mort trop important (environ $70 \mu\text{l}$). Ce volume mort vient de la connection entre la seringue et le capillaire, et du capillaire lui-même. Nous travaillons actuellement à l'élaboration de cellules ayant un volume mort plus faible, avec des capillaires de diamètres internes plus petits et avec une connectique entre la seringue et le capillaire sans volume mort. Cette étape permettra de réduire les quantités de réactifs utilisées. De plus, la conception de cellules plus élaborées, avec plusieurs ports d'injections serait intéressante pour des expériences en pince optique [57]. Ce travail de préparation des surfaces et de la cellule va nous permettre de réaliser nos expériences en molécules uniques sur la traduction, que nous allons présenter dans le Chapitre 5.

Chapitre 5

Observation de l'activité de ribosomes uniques par microscopie de fluorescence.

L'objectif principal de cette thèse est d'observer, en molécule unique, la traduction de l'ARN messager en protéine par un ribosome procaryote (*Escherichia coli*). Pour cela, nous souhaitons pouvoir marquer spécifiquement le ribosome avec un nanocristal semiconducteur (Quantum Dot ou QD) et un acide aminé, la lysine, avec un fluorophore capable d'entrer dans le ribosome sans perturber la traduction. Ce fluorophore, le Bodipy FL, a été décrit dans le chapitre 3. L'étude de ses propriétés photophysiques sera utilisée ici pour des expériences de traduction. Grâce à ces deux marqueurs, nous pouvons colocaliser les ribosomes et les acides aminés qu'ils ont incorporés.

Il faut d'abord obtenir un ribosome qu'on peut marquer spécifiquement, c'est-à-dire avec une modification qui permettra de fixer le QD au ribosome, et cela en un seul point du ribosome. Nous avons donc conçu un ribosome ayant une étiquette GST reconnue par un anticorps fixé au QD. Nous avons vérifié l'activité de ce ribosome, que ce soit dans des mesures d'ensemble, ou en molécule unique. Pour suivre l'activité d'un ribosome unique, nous utilisons un acide aminé lysine marqué avec un Bodipy FL. Ce type de marquage a déjà été testé avec succès sur un autre acide aminé (phenylalanine) en mesure d'ensemble [58]. D'autres espèces de Bodipy (Bodipy TMR, Bodipy TR et Bodipy 650/655), émettant plutôt dans le rouge, ont été utilisés pour marquer des acides aminés afin de faire des réactions de traduction *in vitro* [59], cela avec de bons résultats, mais ils ne sont pas commerciaux. Ces systèmes ont été développés pour remplacer les acides aminés radioactifs (^{35}S dans la méthionine, ou ^{14}C dans la leucine) dans les tests de traduction. Nous avons utilisé le système commercial FluoroTect. GreenLys *in vitro* Translation Labeling System pour observer la traduction en molécule unique, grâce à la fluorescence du Bodipy FL. Nous avons tout d'abord observé la traduction en molécule unique grâce au signal provenant des Bodipy FL portés par les lysines en travaillant avec des ribosomes sauvages. Nous avons ensuite travaillé avec des ribosomes GST et donc marqués avec un QD.

Parmi les expériences présentées dans ce chapitre, les ribosomes modifiés ont été réalisés par nos collaborateurs de l'ICSN. J'ai participé à la réalisation des ARNm, ainsi qu'aux expériences de traduction en solution. J'ai réalisé les échantillons pour les études en microscopie de fluorescence et participé à l'écriture des protocoles expérimentaux.

5.1 Observation en molécule unique de l'incorporation de lysine-Bodipy FL pendant la traduction d'un ARNm poly-A.

Afin de vérifier si nos protocoles étaient valides, que ce soit pour la chimie de surface ou pour la traduction, nous avons réalisé une première expérience avec des ribosomes sauvages adsorbés sur la surface. Nous avons utilisé des ribosomes 70S de souche *E. coli*, n'ayant subi aucune modification. Ici, nous avons traduit un ARNm poly-A (ARNm contenant la séquence d'accroche Shine-Dalgarno, le codon initiateur AUG pour la méthionine, puis une suite d'adénines). On sait que 3 A codent pour une lysine. Pour observer la traduction en microscopie de fluorescence, nous avons utilisé des ARNt lysine-Bodipy FL issus du système commercial précédemment décrit (FluoroTect. GreenLys in vitro Translation Labeling System, Promega). Grâce à la grande qualité de nos surfaces (faible bruit de fond dans le spectre de fluorescence du Bodipy FL, faible non-spécificité des lysines-Bodipy-FL avec la surface), nous avons pu limiter les signaux parasites. Ainsi, nous observons principalement des lysines-Bodipy FL incorporées par les ribosomes sur la surface.

Dans cette expérience, nous observons l'activité de ribosomes accrochés non spécifiquement à la surface. Nous incubons plusieurs fois la solution de traduction avec 10 nM de ARNt lysine-Bodipy FL complexés aux facteurs d'élongation EF-Tu. Après chaque incubation, nous effectuons un rinçage avec du tampon B, et nous prenons un film de la fluorescence en Bodipy FL. Nous n'utilisons pas de système ROXS ici, donc la durée de vie des Bodipy FL est faible (inférieure ou égale à 20 ms).

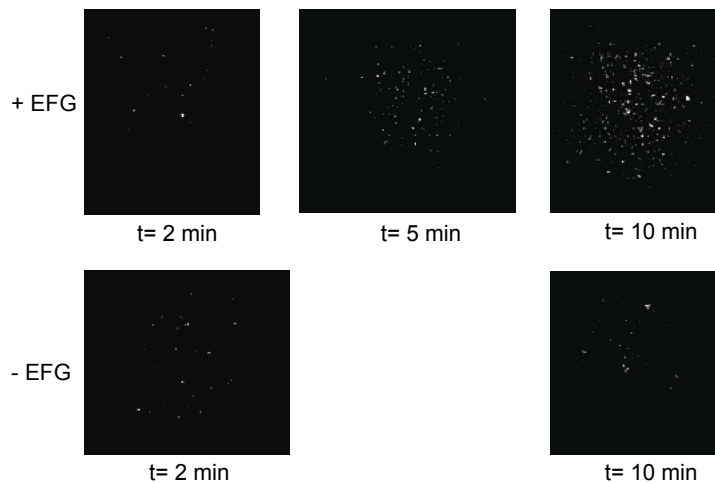


FIG. 5.1 – *Accroissement en signal de Bodipy FL lors de la traduction d'un ARNm poly-A par des ribosomes sauvages. Les différents temps d'incubation sont 2, 5, 10 minutes. A la fin de chaque incubation, nous rinçons avec du tampon R, puis observons le signal de fluorescence en Bodipy FL. Le contrôle est effectué en enlevant l'EF-G qui est un facteur d'élongation qui catalyse la translocation du ribosome avec hydrolyse du GTP. Sans ce facteur, le ribosome ne peut plus se déplacer sur l'ARNm (pas de translocation possible). Le signal sur le contrôle ne s'accroît pas alors qu'il augmente sur l'échantillon test. Ces images sont prises à différents endroits de l'échantillon. Nous pouvons prendre des images à différents endroits car l'échantillon est homogène. Concentration en ARNt lysine-Bodipy FL : 5 nM. Température : 22°C. Durée d'acquisition des images : 100 ms. Intensité sur la surface à 488 nm : 1 kW/cm².*

Comme on peut le voir sur la Figure 5.1, le signal en Bodipy FL s'accroît au cours du temps. On voit de plus en plus de spots brillants, correspondant à des ribosomes actifs.

Certains ribosomes sont plus lents que d'autres, donc on ne les voit pas au début. Cette dispersion dans la vitesse de traduction provient sûrement du caractère non spécifique de l'accroche du ribosome à la surface. Donc, les ribosomes sauvages sont capables d'incorporer des ARNt-lysine-Bodipy FL et de traduire un court ARN poly-A. Le temps nécessaire pour traduire ce poly-A (court, seulement 4-6 codons) est très long, comparativement à ce qui se passe *in vivo*, c'est-à-dire 20 acides aminés par seconde [24]. La principale raison est la faible concentration en ARNt lysine-Bodipy FL, qui est ici de 5 nM. Dans un extrait cellulaire, la concentration en ARNt-(acide aminé) est plutôt de l'ordre 0,1-1 mM.

Grâce à cette expérience, nous pouvons montrer que les ribosomes restent actifs dans nos conditions expérimentales. Le protocole de chimie de surface ainsi que celui de traduction ne sont pas incompatibles avec nos études.

Ces résultats sont encourageants, mais nous devons améliorer notre système. On ne peut pas colocaliser ici les ribosomes avec les polypeptides marqués Bodipy FL, car les ribosomes ne sont pas marqués. Cette étape est nécessaire afin de prouver de manière absolue que la traduction a bien eu lieu. Nous avons effectué des expériences similaires en marquant les lysines accessibles des ribosomes avec des Cy5-NHS, mais nous n'avons jamais été en mesure de prouver l'activité des ribosomes dans ces conditions. Ce type de marquage peut inhiber la traduction en se fixant sur des zones sensibles du ribosome. Il nous faut donc développer une approche pour marquer spécifiquement le ribosome sans entraver son activité.

Le caractère non spécifique de l'accroche des ribosomes à la surface rend la répétabilité des expériences aléatoire. Donc, il est nécessaire d'avoir une accroche du ribosome à la surface purement spécifique pour être en mesure d'avoir des résultats reproductibles et quantifiables. Ce problème a été résolu dans le Chapitre 4.

5.2 Elaboration d'un ribosome ayant une mutation spécifique pour l'accroche d'un QD.

Pour marquer ou fixer spécifiquement un ribosome procaryote sur une surface, il y a deux stratégies. Une consiste à muter l'ARN ribosomal, l'autre à muter une ou plusieurs protéines du ribosome. Ces moyens ont été testés avec succès.

5.2.1 Etat de l'art des modifications déjà réalisées sur des ribosomes pour y effectuer une accroche spécifique.

Modification de l'ARN ribosomal.

Le groupe de J.D. Puglisi (Stanford) a choisi de rajouter une boucle dans l'ARN 16S afin d'y hybrider un oligonucléotide biotinylé servant de point d'accroche à la surface [60]. Comparé aux ribosomes sauvages, les auteurs évaluent à plus de 90% le pourcentage de ribosomes ayant une activité traductionnelle en mesure d'ensemble (lié ou pas à un oligonucléotide). De plus, ils estiment à 50% le ratio de ribosomes actifs à la surface.

Cette approche a été utilisée dans deux travaux [31, 22]. Dans [31], il s'agissait d'une mesure de force de cohésion du ribosome sur l'ARNm à l'aide d'une pince optique (Figure 5.2). Ici, le ribosome n'a pas d'activité traductionnelle. Les auteurs évaluent la solidité du complexe ribosome-ARNm avec différentes séquences d'ARNm, pour montrer que la séquence la plus stable pour initier la traduction est la séquence Shine-Dalgarno¹ [61].

¹La séquence Shine-Dalgarno (AGGAGGU chez *E.coli*) est une séquence de l'ARNm qui existe uniquement chez les procaryotes. Elle permet au ribosome procaryote de se placer sur le codon initiateur. Elle se situe 16 nucléotides avant le codon initiateur AUG.

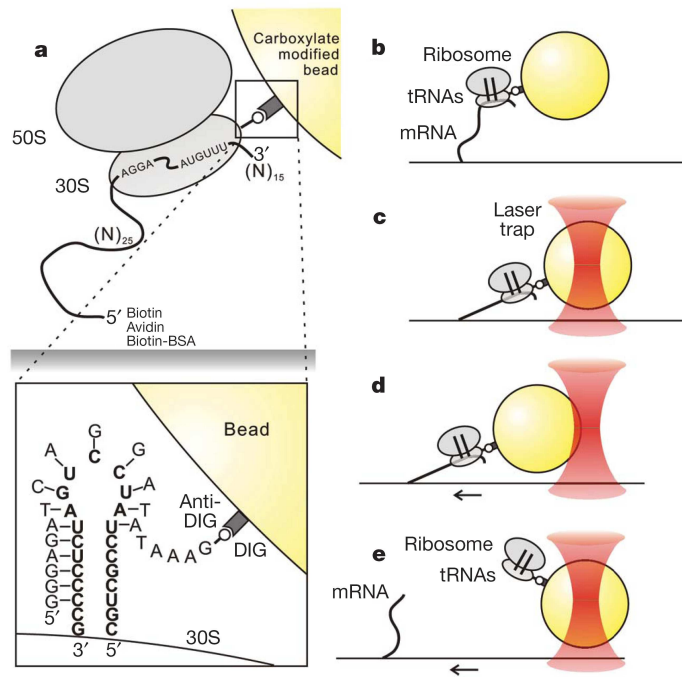


FIG. 5.2 – Schéma de l'expérience réalisée dans [31]. On fixe une bille micrométrique de polystyrène portant des ligands anti-digoxygénines en surface sur la boucle rajoutée de l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome (dessin a). Le ribosome est lié à la surface via une biotine en 5' sur l'ARNm. La bille est piégée par la pince optique. L'échantillon est déplacé avec une platine piezoélectrique. La bille s'éloigne du centre du piège, ce qui génère, en réaction, une force sur la liaison ribosome-ARNm, jusqu'à ce que le complexe se dissocie (dessins b à e). Figure extraite de [31].

Ce même ribosome a été utilisé en microscopie de fluorescence, pour observer la traduction de la GFP [22] (pour Green Fluorescent Protein). La GFP est une protéine fluorescente naturelle dont il existe divers mutants ayant des temps de maturation plus ou moins longs (26 minutes dans le cas de l'uvGFP utilisée ici). L'objectif ici est de prouver l'activité traductionnelle d'un ribosome accroché à la surface. Ce ribosome est fixé à la surface avec la boucle mutante en 16S de l'ARNr, hybridée à un oligonucléotide marqué en 5' avec un Cy3 et biotinylé en 3' pour l'accroche à la surface (Figure 5.3). Les auteurs colocalisent la GFP avec le Cy3, pour bien prouver que ce sont des ribosomes fixés à la surface qui ont traduit. En éliminant l'oxygène de la solution, ils empêchent la GFP de finir sa maturation, et peuvent déclencher celle-ci par l'injection d'une solution contenant de l'oxygène. Ainsi, ils peuvent évaluer le temps pris par la GFP pour prendre sa configuration finale.

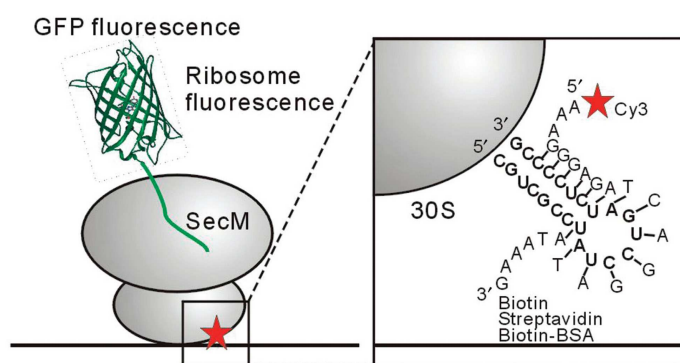


FIG. 5.3 – Schéma de la traduction de la l'ARNm de la GFP issue de [22]. La ribosome est accroché à la surface via l'hybridation de la boucle en 16S de l'ARNr à un oligonucléotide marqué en 5' avec un Cy3. Dans ce travail, la fluorescence de la GFP est colocalisé avec la fluorescence du Cy3. La GFP est entièrement traduite, mais pas relâchée par le ribosome à cause d'une séquence d'arrêt placée en 3' sur l'ARNm (sans codon stop), qui empêche la dissociation du ribosome de la protéine.

Une autre méthode a été utilisée dans le groupe de Yale Goldman. Elle consiste à oxyder l'extrémité 3' de l'ARNr 23S de la petite sous-unité pour y fixer une biotine-hydrazide [62, 16]. Dans ces expériences, les auteurs ont vérifié l'activité traductionnelle du ribosome modifié en incorporant des acides aminés ayant des isotopes radioactifs et en résonance de plasmon de surface. Ils estiment à environ 10% la quantité de ribosomes modifiés actifs en surface.

Modification d'une protéine ribosomale.

L'autre voie consiste à modifier une protéine ribosomale. Comme pour l'ARNr, il faut que cette protéine ne joue pas de rôle dans l'activité du ribosome, pour éviter de perturber la traduction. Dans l'expérience présentée dans [23], on rajoute une cible biotine sur la protéine ribosomale L4, en N-terminal. Le ribosome muté est ensuite accroché à la surface via la biotine pour traduire un ARNm de GFP à maturation rapide (GFPem) (Figure 5.4), évaluée ici à environ 5 minutes. Il y a 10-15% de ribosomes mutés actifs en surface, c'est-à-dire traduisant une GFPem.

Dans le cas des travaux des groupes de Harry Noller et de Taekjip Ha, des protéines ribosomales sont directement mutées par l'incorporation d'un acide aminé cystéine sur un site spécifique [63, 64]. Ces cystéines sont ensuite ciblées pour un marquage spécifique avec

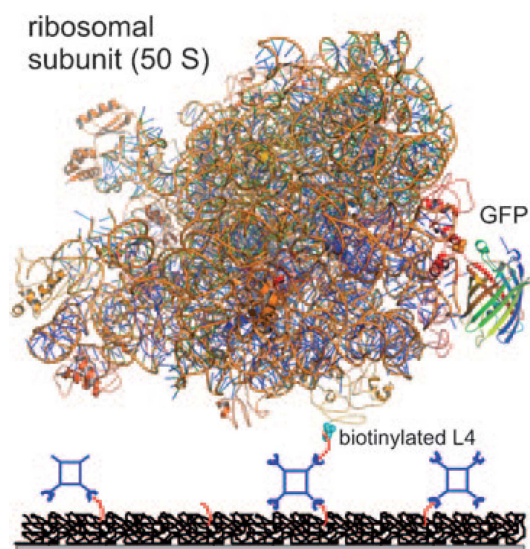


FIG. 5.4 – Schéma de la grande sous-unité 50S contenant une biotine en N-terminal de la protéine L4. Le ribosome est accroché à la surface PEG-biotine-streptavidine via cette biotine. Ce schéma est issu de [23].

un fluorophore Cy3 ou Cy5 pour faire des expériences de smFRET². Elles sont ensuite incorporées dans le ribosome par reconstitution *in vitro* [63]. Les auteurs marquent les sous-unités 30S et 50S sur deux protéines avec la paire donneur/accepteur Cy3/Cy5 pour regarder la rotation d'une sous-unité par rapport à l'autre lors de la traduction de l'ARNm [19] (Figure 5.5).

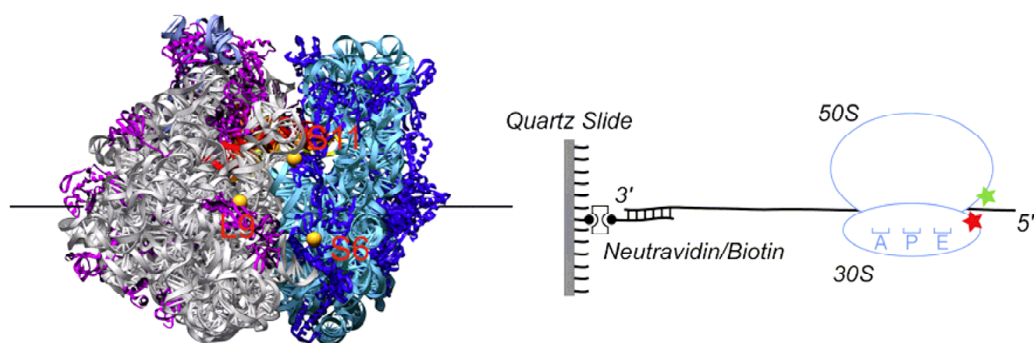


FIG. 5.5 – Image de l'expérience réalisée dans le groupe de T. Ha [19]. À gauche est représentée la structure du ribosome par diffraction de rayons X, avec écrit en rouge les différentes protéines marquées dans l'expérience. La grande sous-unité, représentée en gris, est toujours marquée sur L9 et la petite, représentée en bleu, est marquée soit sur S6, soit sur S11. À droite est représenté le schéma de l'accroche du ribosome à une surface PEG, via un oligonucléotide biotinylé hybridé en 3' de l'ARNm.

²Ces cystéines rajoutées sont les seules apparentes (accessibles) sur les protéines ribosomales ciblées. Les cystéines ont une fonction thiol qui réagit avec une fonction maléimide pour former une liaison.

5.2.2 Notre méthode pour muter un ribosome *E. Coli* par fusion de protéine et purification des ribosomes mutés.

Le protocole que nous avons élaboré est assez similaire à celui utilisé par [23]. Nos collègues de l'ICSN ont réalisé deux groupes de ribosomes mutants, un muté sur la protéine L22 et l'autre muté sur la protéine L4. Ces deux protéines sont situées sur la grande sous-unité 50S du ribosome (Figure 5.6). La mutation consiste en la fusion d'une protéine GST (glutathione-s-transferase) en N-terminal des protéines ribosomales L4 ou L22. Les deux types de ribosomes seront purifiés et leurs activités évaluées comparativement à des ribosomes dits sauvages, c'est-à-dire n'ayant pas subi de fusion avec la GST.

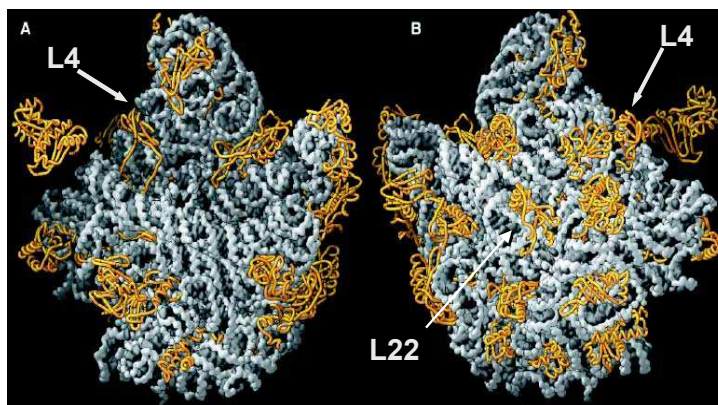


FIG. 5.6 – Structure atomique de la grande sous-unité 50S du ribosome *E.coli* obtenue par diffraction de rayons X. Cette image est issue de [65]. L'image A est une vue de dessus de la grande sous-unité, l'image B est vue de dessous. Les positions respectives des protéines L4 et L22 sont indiquées sur la figure.

Expression et purification des ribosomes mutés.

Cette procédure va être rapidement décrite, mais on peut en trouver une description détaillée dans le protocole intitulé "GST Gene Fusion System Handbook" (Amersham Biosciences), disponible sur le site internet de Amersham Biosciences. Le protocole pour effectuer les deux ribosomes étiquetés avec la GST, sur L4 ou sur L22, est le même. Nous insérons dans des bactéries *E.coli* en phase de croissance une séquence d'ADN contenant le gène de la protéine ribosomale ciblée et le gène de la protéine "cible", la GST (Glutathione-S-Transferase). Cette dernière est située pour être exprimée en position N-terminal de la protéine ribosomale. C'est la protéine de fusion. La séquence complète est placée dans un vecteur ADN permettant de surexprimer ce gène (comparativement à celui du gène de la protéine ribosomale sans protéine cible). Ainsi, dans la bactérie, on aura une majorité de protéines ribosomales fusionnées à la GST. Lors de la fabrication des ribosomes dans les bactéries, ces protéines modifiées seront incorporées dans les ribosomes. A un certain stade de croissance des bactéries, où le gène protéine ribosomale - protéine de fusion est le plus exprimé dans les bactéries, on effectue une lyse (étape qui consiste à briser la membrane cellulaire des bactéries), et nous récupérons les ribosomes par centrifugations successives. Afin de séparer les ribosomes mutés (avec une protéine GST) et les ribosomes non mutés, on utilise une colonne FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) qui va fixer les GST spécifiquement. Nous conservons ensuite les ribosomes 70S (avec les deux sous-unités) dans un congélateur à -80°C .

5.2.3 Tests d'accroche entre les ribosomes-GST et les QD anti-GST.

L'aptitude des ribosomes GST à se lier efficacement aux QD fonctionnalisés avec des anticorps anti-GST (Qdot 655 goat anti-glutathione-s-transférase conjugate, Invitrogen) est évaluée en faisant migrer les ribosomes (GST ou non, avec ou sans QD) sur un gel. Nous présentons les résultats sur la Figure 5.7. Pour cette expérience, nous réalisons un gel d'agarose à 0,5 %, ayant des puits sur sa partie supérieure pour réceptionner les solutions à faire migrer. Ce gel est placé dans une cuve à électrophorèse remplie d'un tampon. Deux électrodes sont situées en haut (anode) et en bas de la cuve (cathode), créant une différence de potentiel. Les acides nucléiques, chargés négativement, vont migrer dans le gel, et cela à des vitesses différentes suivant leur taille. On dispose les solutions à faire migrer dans les puits du gel, immergés dans le tampon. On applique ensuite le champ électrique. Les mailles du gel vont permettre aux molécules biologiques les plus petites de migrer rapidement, et les plus grosses vont migrer moins rapidement. La migration sera plus rapide pour des molécules chargées à cause du champ électrique. On aura donc un double effet dû à la taille et à la charge de la molécule. Le principe évoqué ici est celui de la séparation par l'électrophorèse. Elle permet, suivant le type de gel utilisé, de séparer différentes molécules biologiques présentes dans une même phase aqueuse, en fonction de leurs masses moléculaires ou de leur charge.

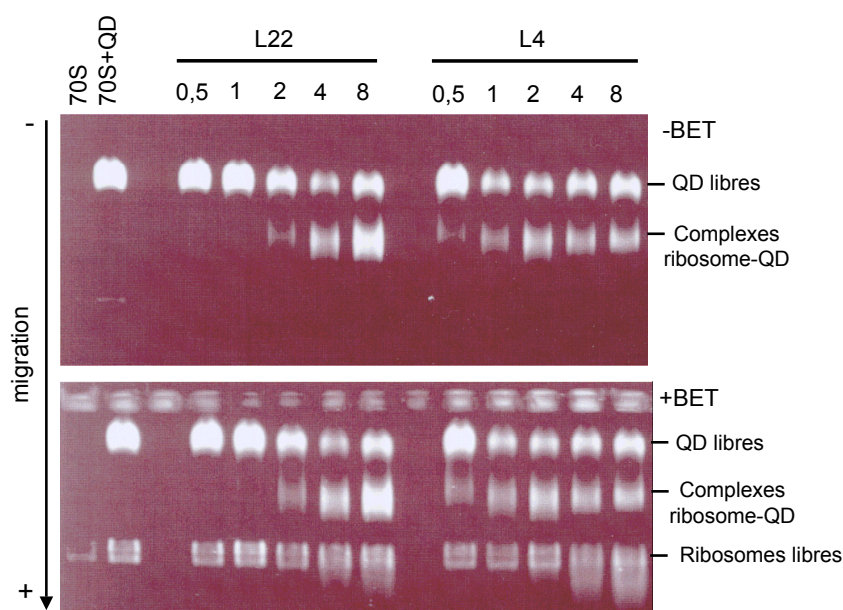


FIG. 5.7 – Analyse par électrophorèse de l'accroche des QD aux ribosomes GST. Les différentes solutions sont déposées dans les puits situés en haut du gel d'agarose à 0,5 %, et migrent vers le bas sous l'effet du champ électrique. Le rapport (ribosome)/(QD) varie en fonction du puits et est indiqué pour L4 et L22 (0,5; 1; 2; 4; 8). Les QD sont observés en fluorescence par excitation UV (image supérieure) et l'ARN ribosomal est marqué au bromure d'éthidium (BET) (image inférieure). Sur la gauche, la flèche représente le sens de migration dans le gel, des espèces chargées positivement (en haut) à celles chargées négativement.

On peut voir dans la Figure 5.7 que seuls les ribosomes marqués GST sont capables de se lier aux QD. Les QD liés aux ribosomes ont une mobilité électrophorétique plus rapide que les QD libres. On peut visualiser les ribosomes en les marquant avec du bromure d'éthidium (BET) (image du bas). C'est un agent intercalant marquant les acides

5.2. ELABORATION D'UN RIBOSOME AYANT UNE MUTATION SPÉCIFIQUE POUR L'AC

nucléiques qui est 20 fois plus fluorescent lorsqu'il est intercalé. Son spectre d'absorption est d'émission dans le proche UV et celui d'émission est centré vers 610 nm (Figure 5.8).

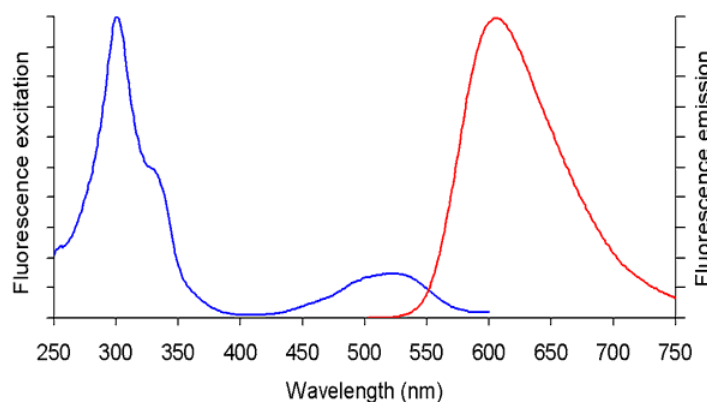


FIG. 5.8 – Spectres d'absorption et d'émission du BET.

Grâce au BET, on vérifie que les ribosomes libres migrent plus vite que les ribosomes liés aux QD, à cause de leur taille inférieure.

L'analyse de ce gel montre que l'augmentation de la concentration de ribosomes GST tend à augmenter la fraction de QD liés jusqu'à un maximum. On a environ 60 % des QD qui interagissent avec les ribosomes GST (Figure 5.9). Augmenter la concentration des ribosomes au delà d'un facteur 4 (par rapport à la concentration des QD) n'augmente pas la proportion de ribosomes liés. Cela est dû au nombre de sites accessibles sur les QD pour les ribosomes. L'encombrement stérique limite le nombre de ribosomes par QD à 4. Cela montre que les ribosomes avec une étiquette GST se fixent bien aux QD, contrairement aux sauvages, qui ne sont pas présents sur la bande de la fraction des ribosomes liés aux QD.

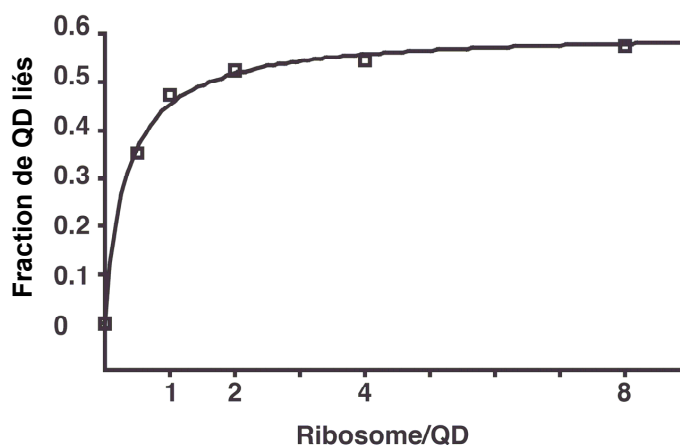


FIG. 5.9 – Les intensités des bandes correspondant aux QD liés sont reportées sur ce graphique. On normalise l'intensité de la bande "complexes ribosome-QD" par la bande "QD libres" pour chaque concentration. La fraction liée est tracée en fonction du ratio (ribosome L4-GST)/(QD). L'ajustement est du type Michaelis-Menten, soit une fonction du type fraction de QD liés = $K/(1+R_{max}/R)$, K étant une constante (nombre maximal de ribosome liés par QD), R_{max} la constante de saturation ($K/2$) et R le ratio Ribosome/QD.

On a réalisé aussi un test sur la concentration en QD nécessaire pour avoir la quantité maximale de ribosomes liés à un QD (même type de données que sur la Figure 5.9, avec en ordonnée la fraction de ribosomes liés et en abscisse le ratio QD/ribosome). Le problème est qu'on sature la caméra imageant le gel avec les QD, on doit donc refaire cette expérience avec moins une concentration en ribosome moins importante. On estime le plateau à environ 60% des ribosomes-GST (L4 ou L22) liés à un QD, pour une concentration en QD environ 3 fois supérieure à la concentration en ribosome.

5.2.4 Tests d'activité comparés des ribosomes mutés en mesure d'ensemble, avec et sans QD.

Il est nécessaire de vérifier que l'activité des ribosomes-GST est bonne comparée à des ribosomes sauvages, ou du moins suffisante pour qu'ils puissent être utilisés dans nos expériences de microscopie de fluorescence. Pour tester cette activité traductionnelle, nous utilisons le Rapid Translation System (R.T.S.), de chez Roche. C'est un extrait cellulaire contenant tous les composants pour obtenir une protéine à partir d'un plasmide. Les composants sont répartis en différents tubes : la solution de lyse, les acides aminés et l'acide aminé Met. La solution de lyse contient des ribosomes sauvages, qu'on extrait au préalable par ultra-centrifugation (55000 g, 3h). Nous utilisons le plasmide fourni par Roche (RTS control pIVEX GFP expressing vector), qui code pour une GFP.

Nous effectuons les tests d'activités des ribosomes marqués GST en L4 et L22 avec et sans QD, en comparaison des ribosomes sauvages (non modifiés), cela à concentrations égales en ribosome. Le RTS, qui va permettre la traduction, est préparé comme indiqué dans le protocole fourni par Roche, avec une solution de lysat dont on aura retiré les ribosomes par ultra-centrifugation. Nous observons l'intensité de fluorescence de la GFP dans un cas, et dans l'autre cas, l'intensité de fluorescence des Bodipy FL provenant des lysines-Bodipy FL incorporées par les ribosomes lors de la traduction de l'ARNm de la GFP. Dans chaque test, nous avons une concentration finale en ribosome de 22 nM, en ARNt lysine-Bodipy FL de 30 nM et en QD de 150 nM.

Les tubes complets sont placés pendant trois heures à 30°C pour effectuer la traduction, puis la réaction est arrêtée en mettant les tubes dans la glace.

Quantification de l'activité de traduction avec la fluorescence de la GFP.

Dans ce cas, nous n'utilisons pas l'ARNt-lysine-Bodipy FL. Nous allons mesurer la fluorescence de la GFP traduite pour chaque test effectué. Pour cela, nous utilisons un spectrofluoromètre (Xenius, Safas Monaco). Le niveau de fluorescence mesuré est comparable pour les ribosomes ayant une protéine L4 modifiée, ceux ayant une protéine L22 modifiée et pour les ribosomes sauvages, en présence ou non de QD (Figure 5.10). Les ribosomes marqués QD, que ce soit en L4 ou en L22, présente une activité comparable aux ribosomes sauvages.

Quantification de l'activité de traduction avec la fluorescence des ARNt-lysine-Bodipy FL incorporés dans la GFP.

Ici, nous mesurons la fluorescence des Bodipy FL incorporés dans la GFP avec les ARNt-lysine pour évaluer l'activité de traduction. Nous reprenons le protocole à la fin de la synthèse des protéines GFP. Nous déposons dans chaque tube 1 μ l de RNase T1 (la ribonucléase T1 est une enzyme qui dégrade les ARN) (diluée 1/10 V/V) dans un tampon Tris 100 mM, NaCl 250 mM. Les tubes sont placés à 37°C pendant une heure. L'ajout de RNase a pour but de dégrader les ARNt-lysine-Bodipy FL non incorporés, afin que les lysines-Bodipy FL non incorporées sortent plus vite du gel pour avoir un signal propre.

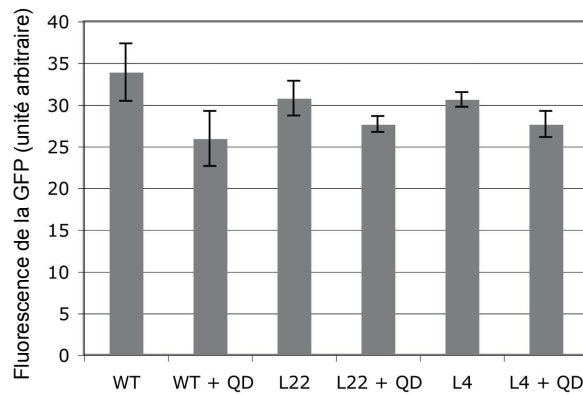


FIG. 5.10 – *Histogramme de l'activité des ribosomes 70S et des ribosomes marqués GST, avec ou sans QD, évaluée par mesure de la fluorescence de la GFP (absorption à 488 nm, émission vers 505 nm).*

Ensuite, nous reprenons 5 μ l de chaque test dans un nouveau tube. Nous y ajoutons 5 μ l de tampon 4X NuPAGE (Invitrogen)³, et 10 μ l d'eau milliQ. Nous plaçons ces tubes à 70°C pendant 10 minutes. Pour séparer la GFP de toutes les protéines présentes dans le kit R.T.S. et des lysine-Bodipy FL, nous faisons migrer le résultat de la traduction ainsi préparé sur un gel Bis-Tris 4-12% (NuPage Bis-Tris Gel, Invitrogen). Comme ce gel est dénaturant pour les protéines, la GFP ne fluoresce pas. Après migration par électrophorèse, nous plaçons le gel sur un scanner (Typhoon, GE Healthcare) pour observer la fluorescence des Bodipy FL incorporés dans les protéines GFP (Figure 5.11).

On remarque une bande très marquée sur la Figure 5.11 qui correspond à la masse molaire de la GFP, 30 kDa. C'est normal, car nous n'avons que cette protéine synthétisée pendant la réaction, donc c'est la seule à être marquée Bodipy FL. Nous observons des bandes de plus faibles intensités sur le gel, elles correspondent à des fragments de GFP. Comme attendu, en utilisant l'extrait de cellule déplété en ribosome (RTS-70S), on ne détecte pas de produit de traduction (Figure 5.11, puits 7). L'intensité des bandes correspondant aux puits des ribosomes sans QD (sauvages, L22 et L4), est quantifiée et est représentée sur l'histogramme de la Figure 5.12. En absence de QD, les ribosomes sauvages et les ribosomes marqués GST en L4 montrent une activité similaire, alors que les ribosomes marqués en L22 montrent une activité inférieure de 30%.

Pour le moment, nous n'avons pas pu évaluer correctement l'activité de traduction des ribosomes complexés aux QD car la plupart des protéines sont retenues dans les puits, et ne peuvent pénétrer dans le gel dans des conditions dénaturantes (Figure 5.11, lignes 2, 4, 6). Il est possible que le tampon utilisé dans l'électrophorèse forme une structure insoluble entre les QD et les protéines. Nous avons tenté de dépler le produit de traduction en ribosome et en QD par centrifugation, mais les résultats étaient aléatoires. Malgré cela, la protéine ribosomale L4 représente une bonne cible pour être modifiée ou marquée, sans changer l'activité du ribosome.

5.3 Elaboration des différents ARNm.

Pour observer la traduction des ribosomes marqués GST, nous avons utilisé différents ARNm. En effet, les différentes expériences préliminaires nous ont amenés à élaborer de

³Contient du SDS, dodécylsulfate de sodium, qui détruit les liaisons non covalentes des protéines, et donc les dénature, pour faciliter la migration sur gel. Ici, la vitesse de migration est fonction de la taille des protéines, et non de leur charge.

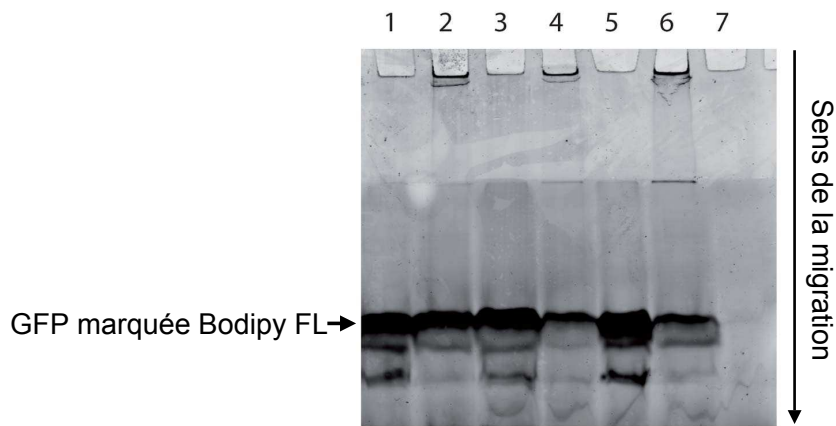


FIG. 5.11 – Image en fluorescence de l'analyse sur gel NuPAGE du produit de synthèse de la protéine GFP. Dans cette expérience, nous avons déposé le produit de traduction dans les puits du gel (visibles en haut du gel, en dessous des chiffres), qu'on a fait migrer par électrophorèse. Cette technique va séparer les protéines par taille sur le gel. Sous l'effet du champ électrique, les protéines vont migrer vers le bas. Les petites protéines migrent plus vite que les grandes. On fait migrer en même temps un étalon sur un des puits (non présent sur l'image). Cet étalon contient des protéines de masses connues colorées. Les bandes de différentes couleurs sont visibles à l'oeil nu après migration et indiquent la masse correspondant aux bandes obtenues avec les échantillons de notre expérience. La GFP est présente sur la bande correspondant à une masse moléculaire de 30 kDa. Les bandes qu'on voit en dessous sont des fragments incomplets de GFP.

(Puits 1) Extrait de cellule pour traduction Roche (RTS) déplété en ribosome et reconstitué avec 20 nM de ribosomes sauvages,

(Puits 2) Identique au puits 1 plus 160 nM de QD,

(Puits 3) RTS - ribosome 70S reconstitué avec 20 nM de ribosomes marqués GST en L22,

(Puits 4) Identique au puits 3 plus 160 nM de QD,

(Puits 5) RTS - ribosome 70S reconstitué avec 20 nM de ribosomes marqués GST en L4,

(Puits 6) Identique au puits 5 plus 160 nM de QD,

(Puits 7) Extrait de cellule pour traduction Roche (RTS) déplété en ribosome (RTS-70S).

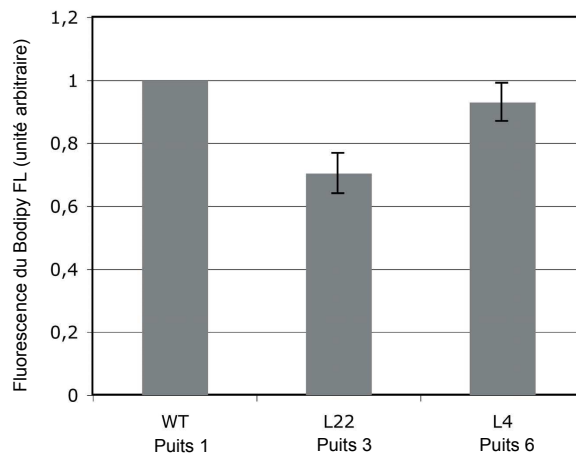


FIG. 5.12 – Histogramme obtenu en collectant la fluorescence due aux lysines-Bodipy FL incorporées dans la GFP en absence de QD. Le gel NuPAGE est imagé par un scanner Typhoon pour la détection des Bodipy FL. Les intensités de fluorescence des bandes correspondant à la GFP ont été mesurées et corrigées par rapport au niveau du fond, et normalisées par rapport à l'intensité du signal relevée avec les ribosomes sauvages.

nombreux schémas expérimentaux afin d'arriver au système final. Nous présentons deux ARNm. Le premier est un poly-adénine, appelé poly-A, qui code pour une poly-lysine (3 adénines codent pour l'acide aminé lysine et l'ARNt de la lysine-Bodipy FL porte l'anti-codon UUU.). Nous fixons une biotine à cet ARNm (biotinylation) pour l'accrocher à la surface PEG-biotine-streptavidine. L'autre ARNm code pour une GFP, avec une séquence supplémentaire en 3' d'environ 100 nucléotides. Après chaque réaction, nous finissons par une extraction au phénol⁴ pour éliminer les RNases, enzymes détruisant les ARN, et on récupère la phase aqueuse (non miscible avec le phénol). Les ARNm sont purifiés ensuite par gel d'acrylamide en condition dénaturante. L'ARNm voulu est extrait du gel par électroélution. On effectue ensuite une autre extraction au phénol. Enfin on réalise une précipitation à l'éthanol pour récupérer les ARNm et les reprendre à la bonne concentration, et les conserver à -20°C.

5.3.1 Synthèse de l'ARNm poly-A.

Un fragment du vecteur puc118 contenant le gène 32 du phage T7, se terminant par le codon initiateur ATG est amplifié par PCR en utilisant les amorces 5'-TTG TTT GCC GGA TCA AGA GCT A-3' et 5'-CAT TTT TAT TTC CTT TTT AAT TTA ATT TAA TTA ACA GTT G-3'. Le fragment amplifié est ensuite transcrit⁵ *in vitro* en utilisant la polymérase⁶ d'ARN T7, et purifié sur un gel dénaturant TBE-7M d'acrylamide-urée à 15%. Après électro-élution et récupération de l'ARN, une extrémité poly-A est ajoutée en 3' en l'incubant dix minutes avec une polymérase d'ARN poly-A (NEB) avec 1 mM d'ATP⁷. L'analyse par PAGE confirme que tous les ARNm ont bien été poly-adenylés avec l'addition d'environ 50 adénines.

5.3.2 Biotinylation de l'ARNm.

Cette méthode peut être utilisée pour n'importe quel ARN. Le protocole a été établi dans Stapulionis et al.[16]. Il se décompose en différentes étapes :

1. Il faut préparer fraîchement une solution de NaIO₄ à 100 mM. On ajoute cette solution (concentration finale 1mM) à 600 pmol d'ARN. La réaction est incubée sur de la glace dans l'obscurité pendant 10 minutes.
2. Après y avoir ajouté une solution (fraîchement préparée) à 500 mM de Na₂SO₃ (concentration finale 5 mM), on laisse incuber le mélange 10 minutes de plus sur la glace dans l'obscurité.
3. On rajoute ensuite 3 mM de biotine-hydrazide (Sigma)(stock à 10 mg/ml dans du diméthylsulfoxyde) et on laisse incuber à température ambiante pendant 60-90 minutes. L'excès de biotine-hydrazide est éliminé par microdialyse (3 kDa MWCO) contre de l'eau milliQ toute une nuit. On conserve l'ARN biotinylé à -20°C.

5.3.3 Synthèse de l'ARNm GFP avec une extension en 3'.

Le gène codant pour la GFP est amplifié par PCR depuis le plasmide pIVEX2-3 (Roche) puis purifié. Lors de la PCR, le terminateur est situé 120 nucléotides en aval du codon stop de la GFP. On y rajoute une extension dont la séquence est 5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT GTA-3' pour l'hybridation d'un oligonucléotide

⁴Le phénol oblige les protéines à se placer à l'interface eau/phénol.

⁵La transcription est l'étape de fabrication de l'ARNm à partir de l'ADN.

⁶Protéine dont l'action consiste à fabriquer des chaînes de nucléotides.

⁷Adenosine triphosphate, apporte l'énergie nécessaire aux réactions en milieu biologique en s'hydrolysant en ADP

biotinylé. A partir de cette séquence d'ADN, on synthétise l'ARNm par transcription *in vitro* avec la polymérase T7 comme décrit dans Puglisi et al.[66]. Le produit de la transcription est purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Après électro-élution⁸ et précipitation à l'éthanol, les ARNm sont repris dans l'eau, et conservés à -20°C.

5.4 Expériences en molécule unique avec les ribosomes marqués QD.

Nous avons réalisé une expérience pour prouver l'activité des ribosomes mutés liés à la surface de la lamelle de microscope. Elle consiste à utiliser les ARNm de la GFP précédemment décrits avec des ribosomes marqués GST liés à un QD fonctionnalisé anti-GST émettant à 655 nm. Dans ce cas, c'est l'ARNm qui est accroché à la surface, comme présenté dans la Figure 5.13.

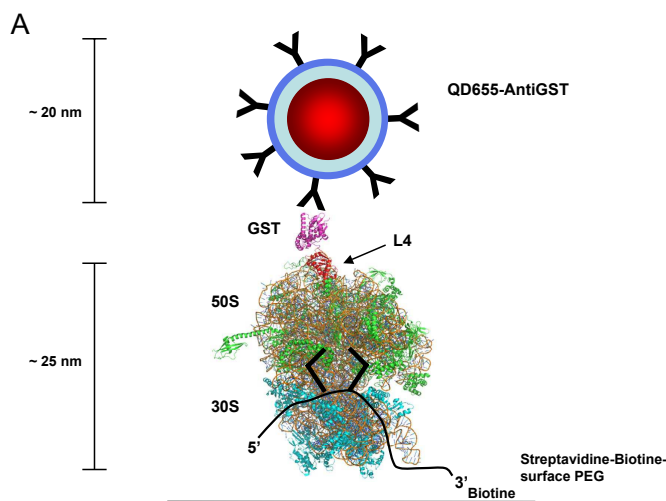


FIG. 5.13 – Schéma du ribosome muté sur la protéine *L4* lié à un QD accroché par l'anticorps anti-GST. On a représenté un ARNm dans le site A et un autre dans le site P. Le ribosome est accroché à la surface PEG via l'ARNm en 3'. Ce schéma est à l'échelle, conformément aux informations d'Invitrogen concernant le QD. Le QD a une taille comparable au ribosome.

5.4.1 Synthèse d'une protéine GFP par un ribosome-QD.

L'objectif de cette expérience est de prouver l'activité de traduction des ribosomes-GST marqués avec un QD. L'ARNm GFP que nous avons synthétisé contient un codon stop⁹, c'est-à-dire que lorsque le ribosome arrivera à ce codon, il va terminer la protéine, la relâcher et se dissocier de l'ARNm. En microscopie de fluorescence, cet événement correspondra à la diffusion du QD hors du champ évanescent, et donc à la perte du signal de fluorescence. Nous allons déterminer l'activité des ribosomes en observant leur départ de la surface (c'est-à-dire la disparition des QD de la surface), et montrer qu'il s'agit bien d'une traduction en effectuant deux contrôles, un avec un antibiotique qui empêche la traduction d'avoir lieu, et un autre avec une solution de traduction sans acides aminés.

⁸Méthode pour extraire un échantillon d'un gel en appliquant une différence de potentiel dans le plan de la plus petite dimension du gel pour amener les macromolécules à la surface.

⁹Il en existe 3 : UAG, UAA et UGA, qui ont tous le même rôle.

Dans les deux cas, le ribosome ne quittera pas la surface, donc les QD seront toujours visibles à la fin de la prise de données. Nous ne regardons pas la fluorescence de la GFP, car celle-ci mature, c'est-à-dire acquiert sa géométrie 3D finale dans laquelle elle est effectivement fluorescente, après plusieurs heures. En effet, nous utilisons l'ARNm de la GFP fourni par Roche dans le RTS 100 E. coli HY Kit. Il est conseillé dans le protocole, pour une observation en mesure d'ensemble, de laisser le produit de traduction 24 heures à +4°C pour que la GFP soit mature, et donc fluorescente.

Protocole expérimental.

Nous détaillons ici la partie de l'expérience concernant la préparation de la cellule microfluidique décrite dans le Chapitre 4.

La cellule a suivi les étapes de fonctionnalisation PEG décrites précédemment (Chapitre 4), auxquelles on ajoute les étapes suivantes :

1. Après avoir rincé la cellule avec le tampon bicarbonate de sodium à 100 mM (pH 8,3), puis avec du tampon A, on incube la surface avec du Blocking Reagent (Roche) à 10 g/l pendant 40 minutes.
2. On rince avec 0,3 ml de tampon R à l'aide du pousse-seringue, à un débit relativement faible (100 μ l/min), pour ne pas enlever la couche de Blocking Reagent protégeant des interactions. On injecte ensuite les ribosomes-GST marqués QD (concentration : 2 nM) dans la cellule. On laisse incuber pendant 10 minutes. On rince à nouveau avec le tampon R comme pour le rinçage du Blocking Reagent. Cette étape est importante car elle permet de repérer les zones propres de la surface, c'est-à-dire où il n'y a pas d'interactions non-spécifiques, pour y travailler ensuite.
3. On injecte de la neutravidine (0,1 g/l dans le tampon A), qu'on laisse incuber pendant 40 minutes. On rince avec du tampon R (0,3 ml à 0,1 ml/min)
4. On repère une zone propre sans QD sur la surface pour travailler. On injecte les ribosomes-GST marqués QD (2 nM) dans la cellule, on laisse incuber pendant 10-15 minutes. On rince à nouveau avec du tampon R. L'observation montre environ 50 QD uniques sur la surface.

On prépare le kit RTS 100 E. coli HY (Roche) pour l'expérience comme expliqué dans l'annexe A. L'injection dans la cellule est synchronisée avec l'excitation et l'acquisition.

Excitation et collection de la fluorescence des QD émettant à 655 nm.

On utilise un Laser He-Ne émettant à 632,8 nm polarisé linéairement (Thorlabs). On a une puissance à l'entrée du microscope de 17 mW. Nous utilisons le jeu de filtres conçus pour le Cy5, bien qu'il ne soit pas optimal pour des QD émettant autour de 655 nm. En effet, ces derniers sont tellement brillants qu'on peut les observer sans aucun problème.

Observation de la traduction en microscopie de fluorescence pour un ribosome unique.

Nous injectons environ 0,1 ml de kit RTS dans la cellule à l'aide d'un pousse-seringue à un débit de 0,1 ml/min. On déclenche l'excitation et l'acquisition pour faire un film de 200 images, avec 100 ms de durée d'acquisition et 1 seconde de pause entre chaque image. Cela représente un film de 3 minutes 40 secondes. La vitesse de traduction cellulaire se situe autour de 20 acides aminés par seconde. Lors d'une expérience récente en molécule unique [23], les auteurs ont observé une vitesse de traduction d'environ 7 acides aminés par seconde. On estime que la GFP codée par le plasmide pIVEX2-3 GFP (Roche) compte environ 238 acides aminés, donc la durée de traduction sera au minimum de 12 secondes,

si le ribosome se comporte comme *in vivo* et se situera plus probablement aux environs de 40 secondes, car l'environnement du ribosome pour notre expérience est similaire à celui décrit dans [23]. De plus, nous travaillons à température ambiante (22°C), ce qui n'est pas optimum. Le schéma de la réaction ayant lieu est présenté sur la Figure 5.14.

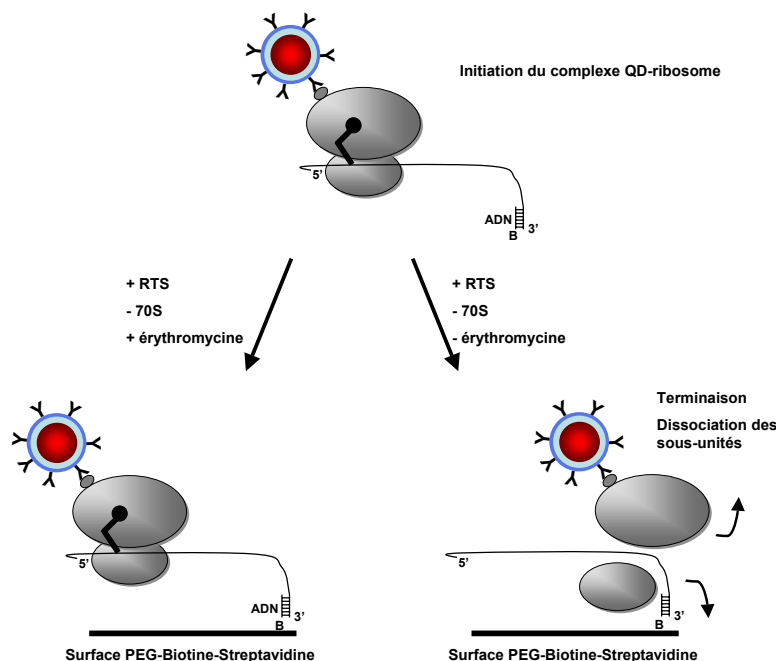


FIG. 5.14 – Schéma expérimental de la traduction d'un ARNm (GFP) ayant un codon stop par un ribosome marqué avec un QD en L4 ou L22. Ici est présenté le contrôle, avec érythromycine (gauche) et l'expérience sans érythromycine (droite). Le ribosome est fixé à l'ARNm en solution (dessin en haut du schéma). Puis on accroche le ribosome par l'ARNm à la surface de la lamelle et on démarre la traduction par l'injection du RTS. Le RTS est déplété de ses ribosomes sauvages avant son utilisation dans les expériences de molécule unique. A la fin de la traduction, le ribosome se dissocie de l'ARNm sans l'antibiotique érythromycine (en bas à droite), et ne se dissocie pas en présence de cet antibiotique (en bas à gauche).

Nous pouvons ensuite injecter la solution de traduction déplétée en ribosomes sauvages dans la cellule, pour observer la disparition progressive des QD, c'est-à-dire le départ des ribosomes lorsqu'ils atteignent le codon stop à la fin de la traduction de leur brin d'ARNm.

Sur la Figure 5.15, l'image de gauche est prise juste au début de l'injection. L'image de droite est prise à la fin du film, c'est-à-dire 3 minutes 40 secondes plus tard. Pendant le film, 21 QD ont disparu de l'image. Il n'y a pas de QD qui disparaissent juste avant la fin du film (sans réapparaître). Il n'y a donc pas de risque de confondre le clignotement des QD avec leur départ définitif lorsque le ribosome se détache de l'ARNm en fin de traduction.

Contrôles pour valider la traduction.

Nous avons effectué deux contrôles sur cette expérience. Le premier consiste à utiliser un antibiotique, l'érythromycine, qui bloque le tunnel de sortie du polypeptide. L'affinité entre le ribosome et cet antibiotique est grande (6 μ M). Cet antibiotique n'agit que s'il y a moins de 8 acides aminés associés par le ribosome. On doit donc incorporer l'érythromycine avant le début de la synthèse, sinon le tunnel de sortie est déjà occupé par le début du polypeptide et l'antibiotique ne peut plus s'insérer. Pour ce faire, nous choisissons de

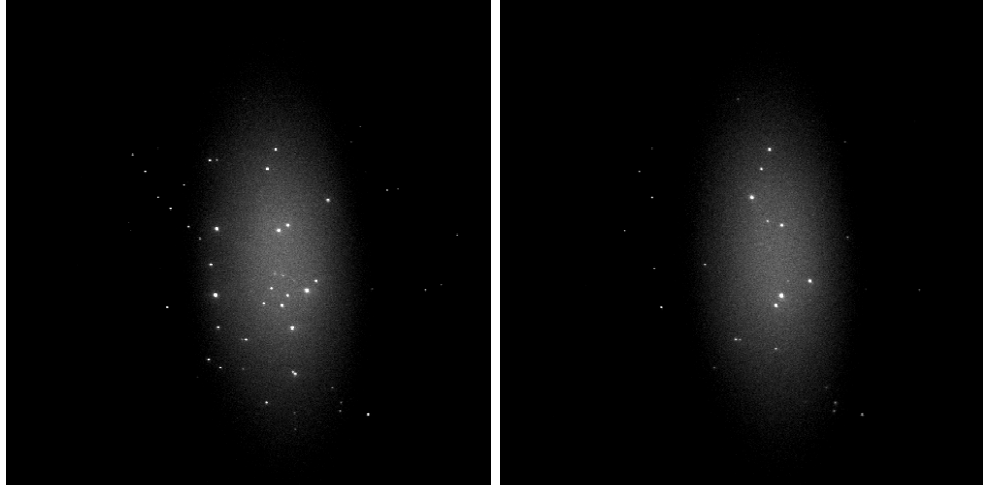


FIG. 5.15 – Première image (à gauche) et dernière image (à droite) du film de la synthèse d'une GFP par un ribosome marqué QD en L22. Il y a 43 QD présents à la surface à la première image. Il en reste 22 à la dernière image, après 3 minutes 40 d'incubation.

mettre le ribosome en présence de l'antibiotique au moment de la dilution des ribosomes à 2 nM. On incube 10 minutes les ribosomes avec 3 mM d'érythromycine, juste avant l'injection des complexes ARNm-ribosomes QD dans la cellule. On dispose ensuite cette solution dans la cellule microfluidique, puis on injecte la solution de traduction. Le tampon utilisé pour rincer ne contient pas d'érythromycine, de même que la solution de traduction.

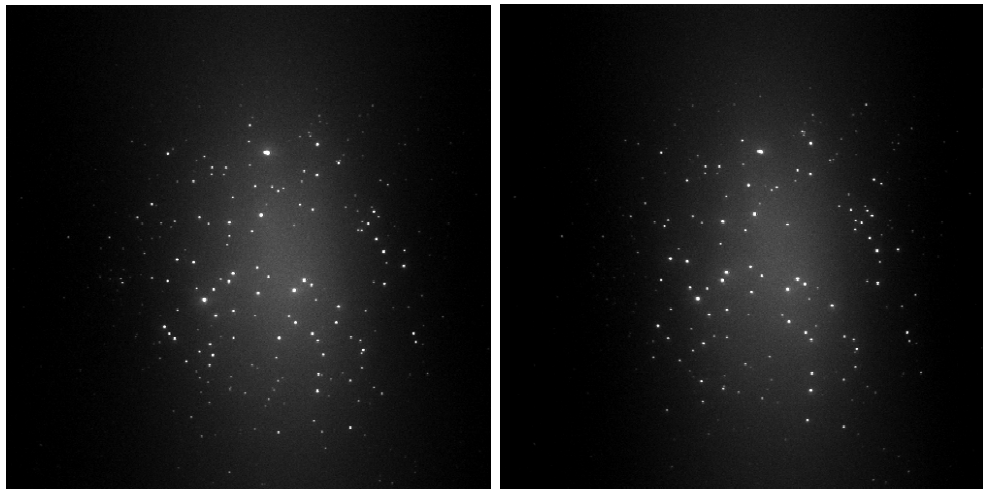


FIG. 5.16 – Première image (à gauche) et dernière image (à droite) du contrôle sur la synthèse de la GFP par un ribosome marqué QD en L22, en présence d'un antibiotique, l'érythromycine (3 mM). On a 96 QD sur la première image, il en reste 78 sur la dernière, après 3 minutes 40 secondes d'incubation du kit RTS.

Des QD quittent la surface avec l'arrivée du kit RTS dans la cellule, il est possible qu'il y ait une interaction entre les ribosomes et le RTS, dissociant les ribosomes-QD de l'ARNm. Il est aussi possible que l'érythromycine ne soit pas complexée avec quelques ribosomes, et donc ceux-ci seraient capables de traduire.

On a effectué un deuxième contrôle avec un kit RTS sans acides aminés, avec un temps d'incubation de même durée. Pour cela, nous injectons la solution du kit RTS, où on a remplacé les acides aminés par de l'eau. Ce contrôle donne un résultat similaire au

contrôle avec antibiotique. Il est possible qu'il y ait une quantité non négligeable d'ARNt chargé dans le lysat du RTS, et que donc la traduction soit encore possible pour une faible quantité de protéines sans ajouter d'acides aminés dans la solution.

Le contrôle sans acides aminés n'est pas concluant, nous avons beaucoup de QD qui partent de la surface, à différentes durées d'incubation. Le contrôle à l'antibiotique érythromycine semble plus intéressant, bien qu'il y ait des QD qui disparaissent de la surface. Une analyse plus complète peut nous aider.

Analyse des données sur la traduction.

Pour déterminer la vitesse de traduction, nous avons évalué le temps entre l'arrivée de la solution RTS au niveau des ribosomes et le départ des QD. Nous avons déterminé dans un premier temps le volume mort de notre système microfluidique, c'est-à-dire le volume entre l'extrémité de la seringue et l'entrée de la cellule. Il est de $71 \mu\text{l}$. Cela équivaut à un temps mort de 43 secondes pour un débit de $0,1 \text{ ml/min}$. La cellule a un volume total plus faible, environ $10 \mu\text{l}$. Nous nous plaçons environ au milieu de la cellule, donc on estime à environ $5 \mu\text{l}$ le volume mort supplémentaire, soit 46 secondes de temps mort total avant l'arrivée de la solution RTS au niveau de la zone d'observation. Nous avons analysé les données de la synthèse de la GFP et du contrôle avec l'érythromycine sur deux histogrammes (Figure 5.17). Sur ceux-ci, on représente les temps de départ des QD de la surface en abscisse et en ordonnée le nombre de QD partis, normalisé par le nombre de QD total présent sur la surface avant injection du RTS, à un temps donné. L'échelle de temps démarre à l'injection, donc il faut compter une quarantaine de secondes pour que le kit RTS soit dans la cellule.

Dans l'expérience de synthèse de la GFP par le ribosome marqué QD en L22, on a initialement 43 QD sur la surface. 21 disparaissent de la surface après 3 minutes 40 secondes d'incubation avec la solution RTS. Dans le contrôle à l'érythromycine, on a 96 QD initialement sur la surface. 18 disparaissent de la surface après 3 minutes 40 secondes d'incubation avec la solution RTS.

Dans l'histogramme des départs lors de la synthèse de la GFP par des ribosomes marqués QD en L22, nous avons distinctement deux populations. La première (5/21 QD qui quittent la surface) se situe vers 40-45 secondes, ce qui correspond au temps d'arrivée de la solution RTS sur la zone d'observation. On a une deuxième population qui se situe vers 60-70 secondes, plus importante que la première (9/21). Les temps de départ de cette deuxième population correspondent à une vitesse de traduction allant de 15 acides aminés par seconde à 9 acides aminés par seconde. Cette vitesse de traduction semble raisonnable étant donné que le ribosome est éloigné de la surface, car l'accroche se fait par l'ARNm (la surface ne ralentit donc pas le ribosome) et que ces valeurs sont compatibles avec les données en mesure d'ensemble (20 acides aminés par seconde)[24]. Les QD qui partent ensuite ne sont pas groupés. La dissociation des ribosomes semble être plus aléatoire. Cela peut provenir de ribosome moins actifs, ou ralentis par l'environnement, ou de pauses lors de la traduction [21], ou qui finissent par se décrocher car inactifs.

Dans le contrôle, la dissociation s'effectue de façon plus aléatoire. Il n'y a pas de population importante correspondant aux temps de traduction de l'histogramme précédent. L'action de l'érythromycine n'est pas parfaite, car on remarque un petit groupement de QD (5 sur les 18 qui partent) qui disparaît entre 70 et 80 secondes après le début de l'injection. Il y a toujours cette population, plus faible ici que dans l'histogramme précédent, qui part à l'arrivée de la solution RTS dans la cellule.

On peut représenter différemment le décrochage des ribosomes-QD de la surface. On peut utiliser un histogramme où on somme les QD disparaissant au cours du temps (Figure 5.18). Cela nous donne une information sur la vitesse moyenne de traduction des ribosome-QD, dans le cas sans érythromycine. On obtient une vitesse caractéristique de traduction

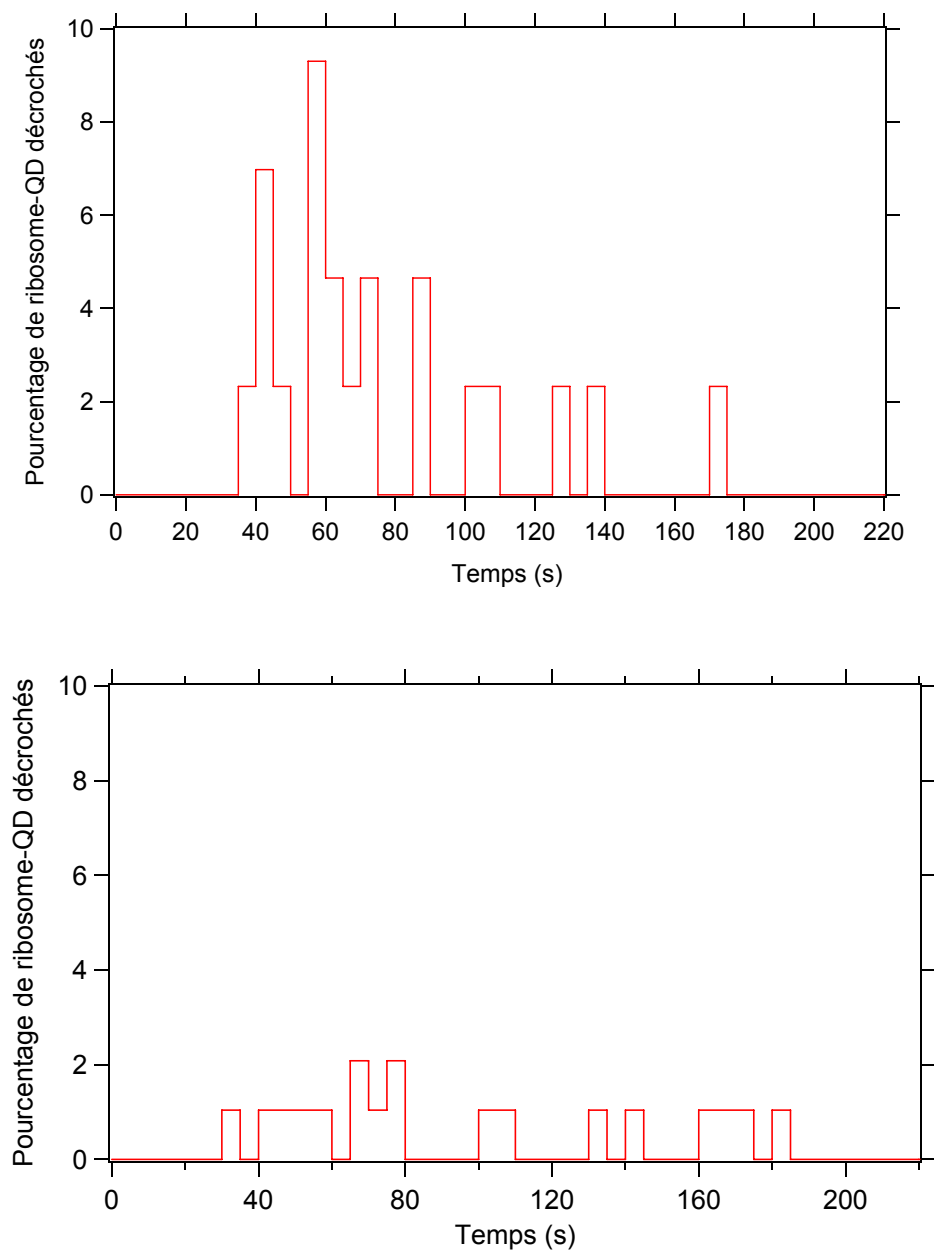


FIG. 5.17 – Histogrammes des temps de départs des QD de la surface pendant une incubation de 220 secondes avec du RTS lors de la synthèse de la protéine GFP par des ribosome marqués QD. Le nombre de ribosome-QD qui se décrochent est normalisé par le nombre de ribosome-QD total sur la surface avant injection du kit RTS. En haut, sans erythromycine, en bas, en présence d'erythromycine.

de 6 acides aminés par seconde.

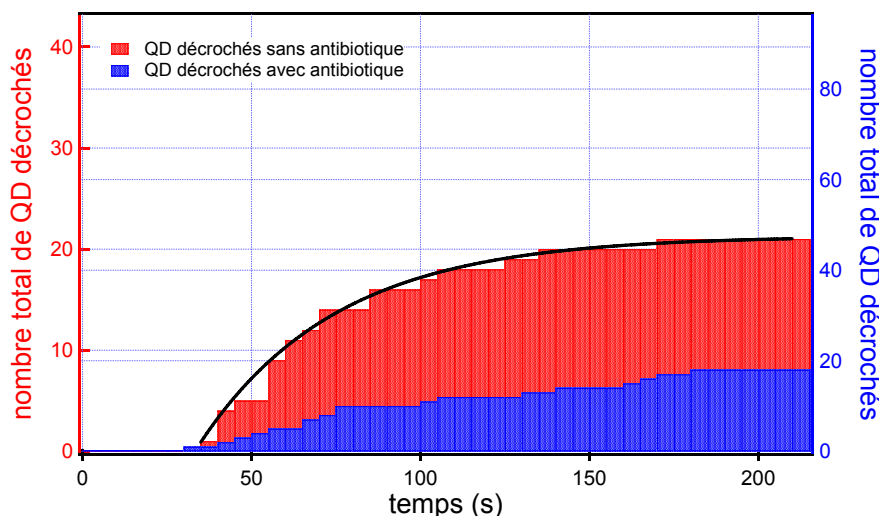


FIG. 5.18 – Sur cet histogramme, on somme les ribosome-QD décrochés au cours du temps. En rouge (ordonnée de gauche), nous avons l'expérience sans antibiotique et en bleu (ordonnée de droite), le contrôle avec antibiotique. Sur chaque ordonnée est représenté la population totale dans le cas de la traduction et dans le cas du contrôle. On peut donc comparer l'activité relative dans les deux expériences. L'ajustement exponentielle (trait plein noir) sur l'expérience sans antibiotique nous donne une vitesse typique de traduction de 6 acides aminés par seconde, sur l'ensemble de la population de ribosome-QD ayant traduit.

Au final, on a une proportion de QD qui partent de la surface deux fois moindre dans le contrôle que dans l'échantillon de synthèse de la GFP. Donc l'érythromycine gêne fortement la traduction et inactive les ribosomes. Pour que son action soit complète, il faudrait reproduire cette expérience en mettant de l'érythromycine dans le tampon de rinçage et la solution de traduction, afin d'être sûr que les ribosomes soient en permanence inhibés. En effet, les ribosomes ne sont pas constamment complexés à l'érythromycine pour une concentration d'érythromycine inférieure à $6 \mu\text{M}$.

Conclusion sur la synthèse d'une protéine GFP par un ribosome marqué QD.

Dans l'échantillon de traduction de la GFP, on remarque que nous avons deux populations qui quittent la surface, une dès l'arrivée de la solution RTS sur les ribosomes (40 secondes après le début de l'injection environ), et une autre environ 30 secondes plus tard. Il semble que le RTS dissocie une partie des ribosomes dès son arrivée dans la zone d'observation, mais il est difficile de savoir ce qui engendre le départ des ribosomes, et donc des QD, de la surface. Dans les deux contrôles, nous avons des QD qui disparaissent de la surface. Cela à des temps très variés durant l'acquisition, mais après l'arrivée du RTS dans la cellule. En effet, les QD ne quittent pas la surface lors de l'injection du tampon. Il y a donc quelque chose dans la solution RTS qui pourrait dissocier les ribosome-QD des ARNm, sans passer par l'étape de traduction. On peut envisager différentes possibilités. Une pourrait être qu'il y a des RNases dans la solution du kit RTS. Cela impliquerait la destruction de l'ARNm, par lequel le ribosome est accroché à la surface. C'est quand même peu probable, car il faudrait une grande concentration en RNase pour avoir un effet aussi rapide (quasi instantanée avec l'arrivée de la solution RTS dans la cellule). Une autre raison pourrait être des ribosomes mal fixés à l'ARNm, incapables de traduire, et dissociés par certains composants de la solution de synthèse des protéines, comme IF3,

qui intervient dans la dissociation des deux sous-unités en fin de traduction, ou encore l'action de tmRNAs présent dans le lysat, qui permettent au ribosome de terminer une traduction alors qu'il n'y a pas de codon stop. Dans l'article de Katranidis et al. [23], les auteurs font en sorte de rendre inactifs les tmRNA présents dans la solution de traduction pour éviter ce genre de problème. Il y a sûrement d'autres raisons qui permettent de dissocier les deux sous-unités, mais nous ne les connaissons pas. Donc pour éviter tout problème d'interprétation, nous allons synthétiser un nouvel ARNm de GFP, la emGFP, qui mature en 5 minutes [23]. Ainsi, nous pourrions colocaliser la fluorescence de la GFP et celle du QD.

5.4.2 Expérience en cours sur l'incorporation de lysine-Bodipy FL par un ribosome accroché spécifiquement à la surface.

Problème de la distance du ribosome à la surface lors des expériences de traduction en molécule unique.

Nous avons réalisé plusieurs expériences avec différents ARNm poly-A. Nous avons réalisé un ARNm comportant plus de 40 adénines, donc codant pour une dizaine de lysines. Cet ARNm contient en 5' une extrémité correspondant au gène 32 du phage T4, et une biotine en 3'. Dans ce cas, la séquence à traduire est directement accrochée à la surface, contrairement à l'ARNm de la GFP utilisé plus haut, où le codon stop est placé 120 nucléotides en amont de la surface PEG. Plusieurs tentatives de traduction en accroche spécifique à la surface n'ont pas abouti. Cela nous a amené à penser que la proximité du ribosome avec la surface pouvait gêner, voire empêcher la traduction. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé l'expérience suivante. Nous avons effectué une traduction en microtube, avec l'ARNm poly-A de 40 nucléotides, et des ribosomes marqués GST en L22 associés à des QD anti-GST. Le contrôle consiste à ne pas mettre d'EF-G, facteur d'élongation nécessaire à la translocation du ribosome. Nous laissons ensuite incuber les complexes ARNm/ribosome-QD sur une surface PEG-streptavidine et observons en TIRFM après rinçage.

Les résultats présentés sur la Figure 5.19 montrent bien que dans le cas où la traduction a été complète, il n'y a pas de QD présents à la surface, donc pas de ribosomes. Si la traduction n'a pas lieu, on observe bien des QD à la surface. Nous avons reproduit plusieurs fois ces expériences, et elles ont montré à chaque fois le même résultat. La taille comparable de la biotine avec l'adénine (voir Figure 5.20) explique ce résultat. En effet, l'entrée du site d'accueil de l'ARNm dans la petite sous-unité du ribosome a une forme d'entonnoir, qui permet à la biotine d'y pénétrer. La biotine rentre dans le tunnel et ne peut plus se lier aux streptavidines de la surface.

Ribosome accroché à la surface par un double-brin d'ADN marqué.

Pour pallier à ce problème d'accroche du complexe ribosome-ARNm à la surface, nous avons dessiné et fait synthétiser (Eurogentec) un double-brin d'ADN ayant une biotine à l'extrémité d'un brin, et un anticorps anti-GST à l'extrémité de l'autre brin. Ce double-brin est long de 20 paires de base. Le brin comportant la biotine a aussi un fluorophore fixé au milieu, un ATTO647n (Figure 5.21).

L'ATTO647n a un spectre de fluorescence comparable à celui du Cy5 (Figure 5.22).

A l'aide de cet ADN double-brin (que nous noterons DBATTO), nous accrochons spécifiquement le ribosome à la surface. Pour cela, nous allons utiliser les ribosomes marqués GST en L4. Cette expérience est présentée sur la Figure 5.23.

Nous souhaitons traduire un ARNm poly-A non biotinylé ne comportant pas de codon stop. Donc, contrairement à l'expérience précédente, le ribosome ne se dissociera pas de

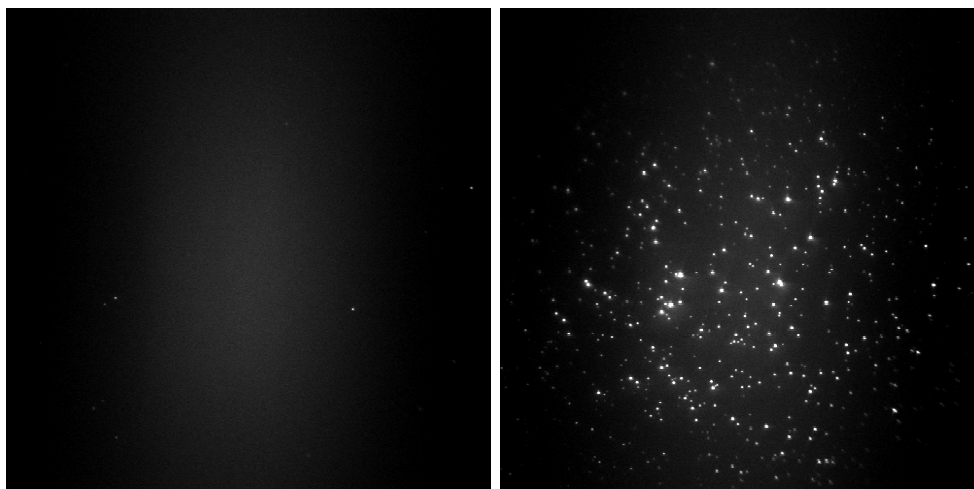


FIG. 5.19 – Image des ribosomes L22 marqués QD sur une surface PEG. Sur l'image de gauche, on a injecté des ribosomes ayant traduit un Poly-A biotinylé en incorporant des lysine-Bodipy FL. Les ribosomes ayant traduit le poly-A empêchent la biotine d'accéder à la surface : on n'observe aucun QD, donc aucun ribosome fixé. Le contrôle, image de droite, a été effectué sur la même zone de la surface de la même cellule. On y a omis le facteur d'élongation EF-G, ce qui empêche la translocation du ribosome, et donc la traduction de l'ARNm. Sans la traduction, la biotine reste accessible et les ribosomes-QD complexés à l'ARNm peuvent se fixer à la surface. Intensité moyenne à 638 nm = 500 W/cm². Durée d'acquisition = 100 ms.

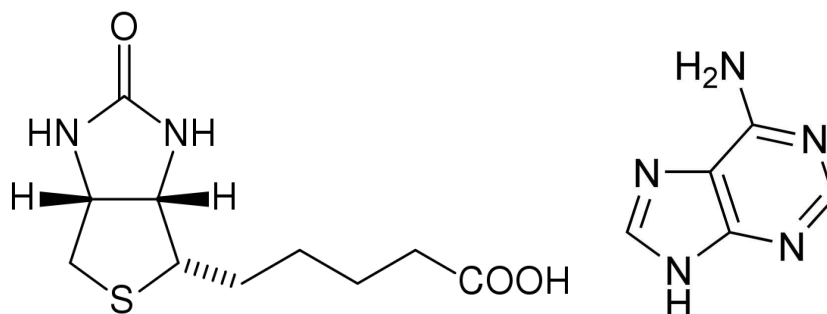


FIG. 5.20 – A gauche, structure chimique de la biotine. A droite, structure chimique de l'adénine.

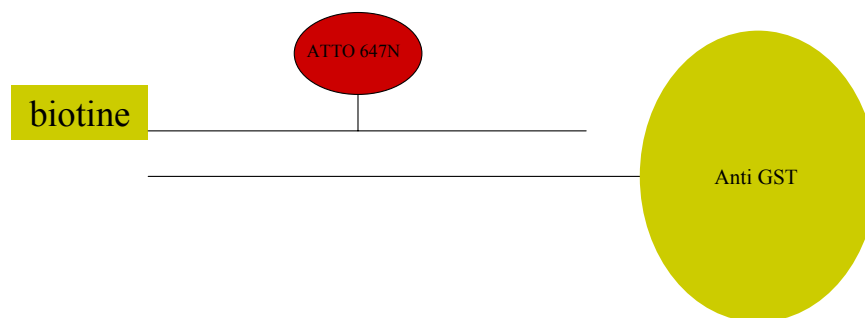


FIG. 5.21 – Schéma du double-brin d'ADN pour accrocher un ribosome-GST à une surface PEG-streptavidine. Il porte une biotine à l'extrémité d'un brin (5' biotine- CCAGTATCAGCAA-TATACCAGCCAGAGTGCG 3'), un ATTO647n au milieu de celui-ci, et l'autre brin (5' anti-GST-CGCACTCTGGCTGGTATATTGCTGATACTGG 3') comporte un anticorps anti-GST. Ce double-brin mesure 20 paires de base. On utilise ici une biotine-TEG. Le TEG correspond à un espaceur de 16 atomes (triéthylène glycol) comportant 4 O qui confèrent des propriétés hydrophiles au bras. L'espaceur permet d'avoir une bonne accessibilité à la biotine.

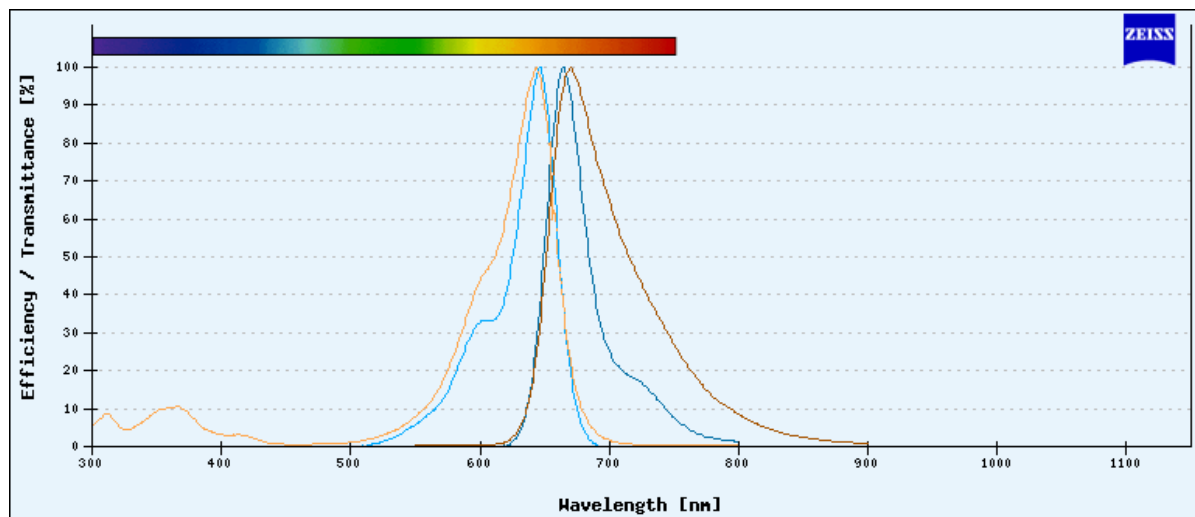


FIG. 5.22 – Spectre d'absorption et d'émission du Cy5 (bleu clair et bleu foncé) et de l'ATTO647 (orange et marron). Ce dernier a des spectres similaires à ceux de l'ATTO647n, avec juste des bandes d'absorption et d'émission plus fines. Image issue du site internet de Zeiss.

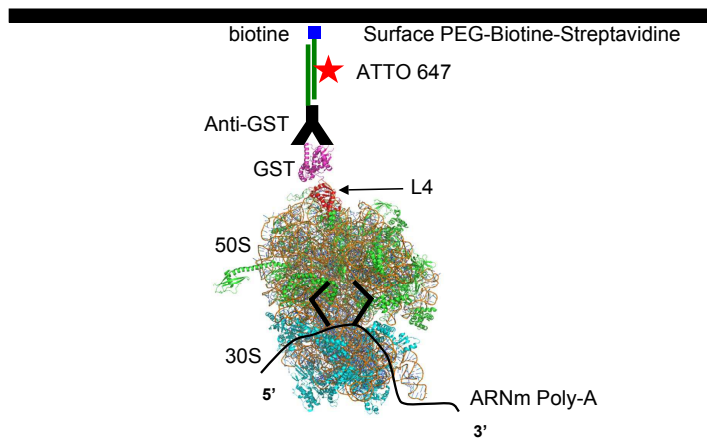


FIG. 5.23 – Schéma d'un ribosome marqué GST en $L4$ fixé à une surface PEG-biotine-streptavidine via un double brin d'ADN présentant un anti-GST à une extrémité et une biotine à l'autre extrémité. Le ribosome est complexé à un ARNm poly-A, en vue d'observer la synthèse d'une poly-lysine, avec des lysines marquées Bodipy FL.

l'ARNm et le polypeptide ne sera pas relâché par le ribosome (du moins, pas sur une échelle de temps de la dizaine de minutes, qui est la durée typique de notre expérience). Nous pouvons réaliser deux expériences complémentaires avec ce schéma.

La première, pour valider l'incorporation d'une chaîne de lysine-Bodipy FL, sera réalisée en microtube, puis les complexes ribosome-DBATTO-ARNm-poly-(lysine-Bodipy FL) seront fixés à la surface. On colocalisera ensuite la fluorescence de l'ATTO647n avec celle des Bodipy FL pour prouver la traduction. Cette expérience préliminaire nous permettra de valider notre protocole expérimental, ainsi que de tester la compatibilité du système ROXS avec le ribosome.

Lors de l'expérience qui suivra, nous fixerons le complexe ribosome-DBATTO-ARNm à la surface, et nous incuberons la surface avec une solution de traduction contenant les ARNt lysine-Bodipy FL. Grâce au système ROXS, nous sommes à même de pouvoir observer les Bodipy FL sur une longue période temps (supérieure à 500 ms), donc nous pourrions prendre plusieurs images de la traduction pour voir l'incorporation des lysines. Cette expérience ne peut être réalisée en direct car la concentration finale en Bodipy FL est trop faible pour ne pas ralentir la traduction. Si on en augmente trop la concentration, le bruit de fluorescence dû aux lysine-Bodipy FL diffusant dans la solution empêche la détection d'un seul Bodipy FL. Après calcul, une concentration en Bodipy FL supérieure à 10 nM rend impossible la visualisation d'un seul Bodipy FL en TIRFM. Pour ne pas saturer la surface par fixation non spécifique, on ne doit pas dépasser 20 nM d'ARNt lysine-Bodipy FL, quel que soit le rinçage effectué par la suite. Donc, pour compter le nombre de lysines-Bodipy FL incorporées, nous allons incuber la solution de traduction pendant une certaine durée, rincer et enfin observer la fluorescence des Bodipy FL, colocalisés avec les ATTO647n.

Cette expérience est en cours de réalisation. Nous souhaitons utiliser le système ROXS pour l'observation de la traduction d'un ARNm poly-A en poly-(lysine-Bodipy FL) par un ribosome marqué GST, car nous avons besoin d'échelle de temps d'observation plus longue que celle conférée par le Bodipy FL dans un tampon classique. Ainsi, on serait capable de compter les Bodipy FL, et donc les acides aminés incorporés, un par un, grâce à la durée de vie du Bodipy FL plus grande que la durée d'acquisition des images.

Le système ROXS améliorant aussi la durée de vie de l'ATTO647n [42], nous sommes capables de l'observer en continu pendant plusieurs dizaines de secondes. On pourra ainsi

vérifier au cours de l'expérience que le ribosome est toujours présent à la surface.

Cette expérience sera un point très positif dans l'observation en microscopie de fluorescence de l'activité du ribosome, car elle ouvrira la voie à beaucoup d'études sur l'interaction ribosome/ARNm lors de la traduction.

Il sera intéressant de pouvoir observer les deux fluorophores en même temps, sans avoir à changer le jeu de filtres de fluorescence du microscope. Pour cela, nous avons développé un système optique permettant de découpler la fluorescence de l'ATTO647n et du Bodipy FL. Ce système nous permet d'imager les deux fluorophores en même temps sur la même caméra en séparant l'image en deux. Il existe une version commerciale, sous l'appellation de "Dual View" (Photometrics, USA), mais qui est coûteuse.

5.4.3 Observation simultanée (colocalisation) du ribosome marqué QD ou ATTO et des lysines-Bodipy FL incorporées.

Le schéma du système optique permettant d'observer simultanément deux fluorophores de spectres d'émission différents est présenté sur la Figure 5.24.

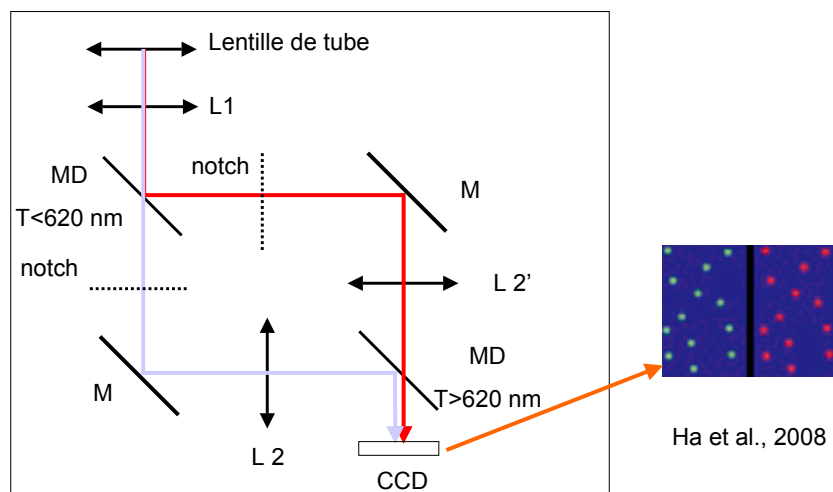


FIG. 5.24 – Schéma du montage de séparation de la fluorescence de marqueurs ayant des longueurs d'ondes d'émission différentes (ici, Bodipy FL et ATTO647n ou Qdot 655). Le plan focal objet de la lentille L1 est confondu avec le plan focal image de la lentille de tube dans lequel se forme l'image de l'échantillon. Un diaphragme est placé dans le plan focal image de la lentille tube pour limiter le champ à la moitié de la surface de la caméra CCD. Le faisceau de lumière est collimaté en sortie de L1. La mise au point sur la caméra se fait à l'aide des lentilles L2 et L2'. L2 et L2' ont la même focale, mais on a choisi d'utiliser 2 lentilles différentes pour la raison suivante. L'objectif présentant un chromatisme résiduel qui mène à une légère défocalisation du signal de fluorescence d'un fluorophore comparé à l'autre. Celui-ci peut être compensé en positionnant légèrement différemment L2 et L2' par rapport à la caméra. Ainsi, la mise au point sur un des marqueurs est instantanée quand elle est réglée pour l'autre. Les lentilles L1, L2, L2' ont les mêmes focales, car nous n'avons pas besoin d'un grandissement supplémentaire. MD désigne les miroirs dichroïques, M des miroirs argentiques. Des filtres "notch" sont placés sur le passage des photons de fluorescence de chaque marqueur pour couper les photons issus des lasers d'excitation.

Lors du réglage des différents composants optiques, notamment des lentilles, nous avons rencontré différents problèmes critiques pour l'observation de molécules uniques fluorescentes :

- La position longitudinale de la lentille L1 (compensant un mauvais réglage de l'objectif de microscope) influe sur l'aberration sphérique présente sur l'image de la CCD. Pour résoudre ce problème, nous avons fixé la position de la caméra CCD au foyer image de L2 (ou L2'), puis réglé la position de L1 pour avoir le minimum d'aberration lors de la défocalisation de l'objectif de part et d'autre de son plan focal.
- Si un décentrement du champ par rapport à l'axe de l'objectif de microscope est rattrapé par un décentrement de la lentille L1, alors on obtient des points images entachés d'aberrations (astigmatisme et coma, taches non circulaires quand on défocalise). Pour éviter cela, on optimise le centrage du laser excitateur et des lentilles L1, L2 et L2'.

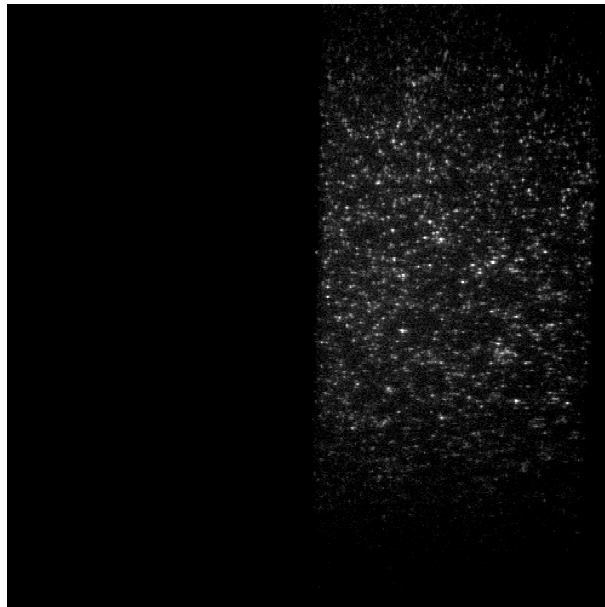


FIG. 5.25 – Image réalisée avec le banc de séparation de l'émission de fluorescence de deux marqueurs différents. A droite, image en TIRFM de Bodipy FL. A gauche, bras de système imageant dans le rouge (pas de marqueurs dans le rouge sur la surface) Durée d'acquisition : 100 ms. Intensité d'excitation $1,8 \text{ kW/cm}^2$.

Ce système sera utilisé dans le cadre de l'étude de l'incorporation de lysine-Bodipy FL avec un ribosome fixé à la surface à l'aide d'un DBATTO. On pourra imager les ATTO647n en même temps que les Bodipy FL. On pourra aussi l'appliquer à l'imagerie d'un ribosome-QD et des lysines-Bodipy FL.

5.5 Conclusion

A travers ce chapitre, nous avons présenté nos expériences en microscopie de fluorescence en molécule unique portant sur la synthèse de protéines par le ribosome.

Nous avons développé un ribosome pour l'accroche spécifique d'un marqueur fluorescent afin d'être capable de l'observer en molécule unique. Nous avons utilisé un QD pour marquer le ribosome, pour ne pas être limité par la durée de vie du marqueur. L'activité du ribosome fixé à un QD n'est pas évidente a priori, du fait de leurs tailles semblables, et n'a jamais été démontrée auparavant. Nos résultats actuels, bien que préliminaires, sont clairement encourageants. On a observé une activité des ribosomes-QD, mais afin de lever tous les doutes, nous sommes actuellement en train de développer l'ARNm d'une GFP, la GFPem, qui mature beaucoup plus vite que celle que nous utilisons actuellement, afin de colocaliser la fluorescence de cette GFP et du QD.

En parallèle, nous avons travaillé sur l'incorporation d'acides aminés marqués avec un fluorophore, pour observer la synthèse de la protéine. Dans ce but, nous utilisons le système FluoroTect. GreenLys in vitro Translation Labeling System de Promega, constitué d'ARNt-lysine-Bodipy FL. Nos expériences sur la traduction d'un ARNm court fixé à la surface n'ont pas été fructueuses. On pense que l'accroche de l'ARNm à la surface gênait ou empêchait la traduction en inhibant le ribosome. Des expériences de traduction en microtubule nous ont démontré que la traduction de l'ARNm poly-A était possible, à condition que celui-ci ne soit pas fixé à la surface. Pour contourner ce problème, nous avons décidé de fixer le ribosome-GST à la surface via un double-brin d'ADN, avec une biotine à une extrémité et un anticorps anti-GST à l'autre. Ce double-brin est marqué avec un fluorophore organique, l'ATTO647n, afin de localiser le ribosome. Cette expérience sera réalisée prochainement. Nous avons aussi développé un système d'imagerie permettant d'observer simultanément deux fluorophores d'émissions de fluorescence différentes, pour observer le QD et la protéine GFP, ou l'ATTO647n et le Bodipy FL, ou encore le QD et le Bodipy FL.

Chapitre 6

Développement d'une pince optique.

Les premières expériences de piégeage de particules diélectriques par un faisceau laser ont été réalisées au début des années 70 par le groupe de A. Ashkin (Bell Laboratory) [67]. Elles consistaient à piéger une particule diélectrique entre deux faisceaux contra-propageants, au point d'équilibre des forces dues à la pression de radiation des deux faisceaux et à la gravité. Les deux faisceaux étaient parallèles à l'accélération de la gravité. Cela a été amélioré ensuite pour piéger la particule à trois dimensions. Dans ces cas, c'était un piège qui permettait de faire léviter la particule, mais pas de la piéger à proprement parler.

Le premier piège, où un seul faisceau permettait de piéger une particule diélectrique, est apparu en 1986 [68]. Les pinces optiques telles qu'on les conçoit aujourd'hui utilisent toujours le même principe : un faisceau laser fortement focalisé, donc avec un grand gradient d'intensité, peut piéger des particules diélectriques micrométriques au niveau du col du faisceau laser. Ceci a permis de développer différentes applications. Nous nous intéresserons dans ce chapitre aux utilisations en biologie.

La première application à l'étude d'un moteur moléculaire a été effectuée dans le groupe de S. Block (Stanford), en 1994 [12]. Le premier moteur moléculaire étudié est la kinésine, sur un microtubule (matériau de base dans la formation du cytosquelette). La kinésine, moteur moléculaire transportant des objets biologiques d'un point à un autre, a pu ainsi être étudiée d'un point de vue dynamique grâce à l'utilisation de la pince optique. Depuis, cette technique a été utilisée dans l'étude de nombreux moteurs moléculaires (myosine, polymérases...), et même récemment du ribosome. Une autre application est la mesure de forces de cohésion dans les systèmes biologiques. Ainsi, la pince optique a été utilisée dans l'étude des forces de cohésion de l'ADN (mesure des forces nécessaires pour le dénouement de la double hélice) ou encore le dépliage de structures secondaires de l'ARN.

Dans le cadre de ce chapitre, nous présenterons le développement d'une pince optique pour des expériences en molécule unique. Ce dispositif a pour vocation d'être appliqué à la mesure de la force de cohésion d'une tige-boucle de l'ARNm, la boucle SECIS. Nous présenterons ici la conception de cette pince, du banc optique du piège à la détection, ainsi que les différentes techniques pour calibrer cette pince.

6.1 Rappels théoriques sur le piégeage par faisceau laser.

Deux forces sont en jeu lors du piégeage d'une bille diélectrique, la force de gradient d'intensité du champ électromagnétique, qui piège la particule, et la force de pression de

radiation, qui repousse la particule. La description théorique n'est pas la même suivant qu'on se situe dans un cas où le diamètre de la bille est beaucoup plus petit que la longueur d'onde du faisceau piège (régime de diffusion Rayleigh), ou dans le cas où le diamètre de la bille est beaucoup plus grand que la longueur d'onde du faisceau piège (régime de diffusion Mie).

6.1.1 Régime de Rayleigh.

Si le rayon a de la bille est tel que $a \ll \lambda$, où λ est la longueur d'onde du laser de piégeage, la force de gradient $\mathbf{F}_{\text{grad}}$ s'exprime de la façon suivante :

$$\mathbf{F}_{\text{grad}} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0 \quad (6.1)$$

avec c la vitesse de la lumière, n_m l'indice de réfraction du milieu ambiant (indice du milieu physiologique 1,38), I_0 l'intensité du faisceau laser sur la particule. α est la polarisabilité de la sphère, et s'exprime :

$$\alpha = n_m^2 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 1} \right)$$

avec a le rayon de la bille et $m = n_p/n_m$, n_p indice de réfraction de la particule sphérique, typiquement de la silice ou du polystyrène pour les applications en biologie.

L'autre force appliquée sur la bille provient de la pression de radiation. Elle a tendance à pousser la particule dans la direction de propagation du faisceau laser (notée $\mathbf{u}_z$). Elle s'écrit :

$$\mathbf{F}_{\text{diff}} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c} \mathbf{u}_z \quad (6.2)$$

avec $\mathbf{F}_{\text{diff}}$ la force de diffusion, suivant l'axe de propagation du faisceau laser et :

$$\sigma = \frac{128\pi^2 a^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 1} \right)^2$$

La bille sera piégée au point où les deux forces s'équilibrent. On remarque que la force de piégeage est proportionnelle au gradient d'intensité du champ électromagnétique, et que donc on a tout intérêt à focaliser fortement le laser de piège pour avoir un piège efficace. On utilisera donc un objectif à grande ouverture numérique, dont la pupille d'entrée est couverte par le faisceau de piège, pour focaliser à la limite de diffraction. Il est même intéressant d'avoir un faisceau plus grand que la pupille d'entrée de l'objectif, afin d'avoir la pupille d'entrée de l'objectif qui diaphragme à partir d'une intensité de $1/e^2$ de l'intensité maximale, ce qui correspond à 10% de perte.

6.1.2 Régime de Mie.

Si $a \gg \lambda$, on se situe dans le cadre de la diffusion de Mie, donc la théorie ici se fait à l'aide des trajets des rayons optiques dans la bille. Celle-ci est un objet diélectrique sphérique ayant un indice de réfraction supérieur (silice : 1,516, ou polystyrène : 1,57) à l'indice du milieu ambiant (en général, de l'eau, soit 1,33). Donc, on aura une partie des photons réfléchi par la bille et une partie réfractée par celle-ci.

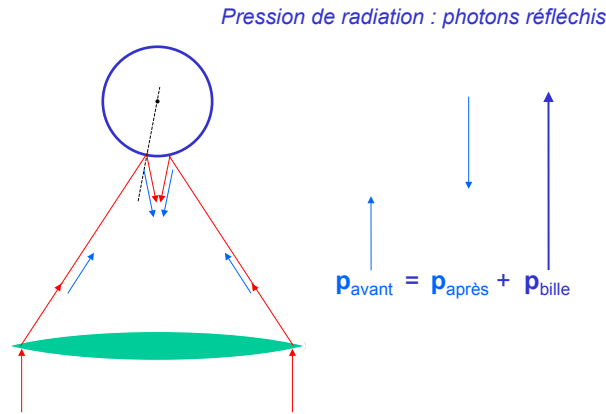


FIG. 6.1 – Schéma représentant l'effet de la pression de radiation sur la bille. Les photons incidents transmettent une partie de leur quantité de mouvement à la bille en se réfléchissant. La bille est repoussée par le faisceau laser.

Dans le cas des photons réfléchis, la conservation de la quantité de mouvement nous dit que la quantité de mouvement des photons avant réflexion est égale à la somme de la quantité de mouvement des photons après réflexion et celle acquise par la bille (Figure 6.1).

Dans le cas des photons réfractés par la bille, nous devons considérer la composante longitudinale (dans le sens de propagation du faisceau laser) et la composante transverse (dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau laser). Quand on observe la composante longitudinale, toujours par conservation de la quantité de mouvement, nous avons une force qui déplace la bille vers le point de focalisation du faisceau laser (Figure 6.2). Les photons réfractés vont participer au piégeage de la bille sur l'axe longitudinal.

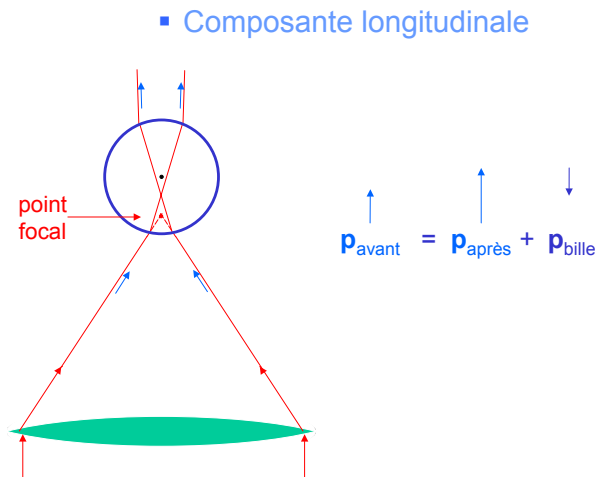


FIG. 6.2 – Schéma représentant l'effet des photons réfractés, donc transmis par la bille sur l'axe longitudinal (sens de propagation du faisceau laser). Les photons réfractés transmettent une quantité de mouvement à la bille qui la ramène vers le point de focalisation du faisceau laser.

La composante transverse doit prendre en compte le caractère gaussien du faisceau laser et le fait que la bille a un rayon beaucoup plus grand que la longueur d'onde du laser. Le profil d'intensité de ce faisceau est une fonction gaussienne. Donc il y aura plus

de photons sur le centre du faisceau que sur les ailes de celui-ci. Dans le cas où la bille se situe sur le bord du faisceau, il y a plus de photons réfractés dans la zone de la bille la plus proche du centre du faisceau laser que de l'autre côté de la bille. Donc il y aura une quantité de mouvement transmise plus importante sur le côté proche du centre du faisceau laser que sur le côté opposé. Par conservation de la quantité de mouvement, la bille sera dirigée latéralement vers le point de plus forte intensité par les photons réfractés (Figure 6.3).

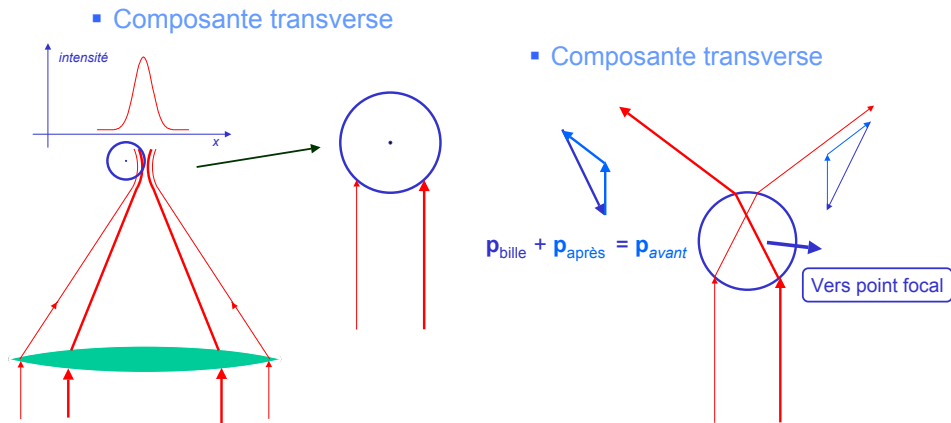


FIG. 6.3 – Le schéma de gauche représente la bille placée sur le côté du faisceau laser, dans la zone de Rayleigh. Celui-ci est gaussien. L'intensité du faisceau étant plus grande au centre que sur les bords du faisceau, il y aura plus de photons réfractés vers le centre que sur le côté opposé (bille représentée à droite, l'épaisseur de la flèche représente la quantité de photons). Donc la quantité de mouvement transmise est plus importante sur la droite de la bille que sur la gauche. À droite, la conservation de la quantité de mouvement impose que la bille est déplacée latéralement vers le point de plus forte intensité.

Cette description géométrique permet à nouveau de montrer que deux forces sont en compétition : la pression de radiation (issue de la partie réfléchi du faisceau), qui pousse la bille dans la direction de propagation du faisceau, et la force de gradient (issue de la partie réfractée) qui amène la bille vers le point de plus forte intensité du faisceau.

6.1.3 Bilan.

Dans le cadre d'expériences de biophysique utilisant une pince optique, les billes utilisées ont un diamètre qui varie typiquement entre $0,5 \mu\text{m}$ et $5 \mu\text{m}$. Le diamètre des billes est donc équivalent à la longueur d'onde du faisceau laser de piège. Dans ce cas de figure, il n'y a pas d'approximation simple pour décrire la pince optique. Des calculs complets ont été effectués par A. Rohrbach et E. H. K. Stelzer, avec des solutions numériques pour les forces de piégeage et de pression de radiation, d'abord en considérant le faisceau de piégeage parfaitement gaussien [69], puis en prenant en compte les aberrations introduites lors du passage de l'interface verre/eau [70].

Pour des considérations techniques, le piégeage sera d'autant meilleur que le gradient d'intensité est grand. Il faut donc fortement focaliser le faisceau. Il est d'ailleurs indispensable d'utiliser un objectif à grande ouverture numérique, et donc à immersion dans l'eau ou dans l'huile, et d'obtenir un faisceau piège dont la taille est limitée par diffraction dans le plan focal image de l'objectif.

Les équations analytiques obtenues dans le cas du régime de Rayleigh, même si elles ne sont plus valables pour les billes utilisées en général, sont tout de même intéressantes. Elles montrent que la pression de radiation est proportionnelle au rapport des indices de

réfraction au carré, alors que c'est un simple rapport des indices dans la force de gradient. On aura donc une force de pression de radiation plus importante avec des billes de polystyrène ($n = 1,57$) qu'avec des billes de silice ($n = 1,43$ à $1,46^1$). Il sera donc plus difficile de piéger des billes de latex que des billes de silice longitudinalement, car la forte différence d'indice entre la bille et le milieu va plus favoriser la force de diffusion que celle de piégeage. Par contre, le rapport des indices est favorable transversalement, car il n'y a pas de force pour contrer la force de gradient. A puissance du laser de piégeage égale, on obtiendra des forces de piégeage transverse supérieures pour des billes de polystyrène.

6.2 Montage du banc laser de piège de la pince optique.

Le montage est assez simple. Il se compose d'un laser infrarouge et d'un objectif à forte ouverture numérique pour focaliser ce faisceau laser pour réaliser la pince optique. Nous avons besoin d'un laser pouvant délivrer au moins 1 W, avec un mode gaussien de bonne qualité, polarisé et stable en puissance et en pointé. Pour ces raisons, les lasers solides YAG sont très utilisés car ils sont puissants, stables, avec un très bon mode transverse pour coût raisonnable. Nous utilisons un laser Nd :YAG (Laser Quantum modèle Forte) délivrant 1 W à 1064 nm. Le microscope inversé utilisé dans notre montage est le même que pour l'expérience en microscopie de fluorescence. On utilise aussi le même objectif, soit un objectif à immersion dans l'huile avec une ouverture numérique (O.N.) de 1,45 (Figure 6.4).

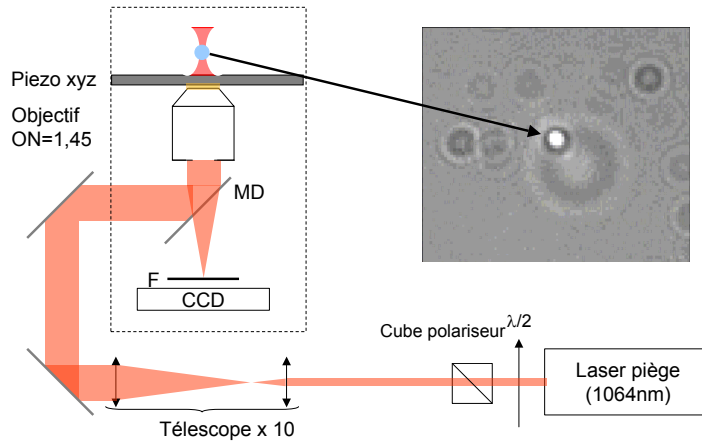


FIG. 6.4 – La puissance du laser Nd :YAG à 1064 nm est contrôlée par l'association d'une lame demi-onde et d'un cube séparateur de polarisation. Le faisceau est agrandi pour couvrir la pupille d'entrée de l'objectif de microscope (7 mm) à l'aide d'un télescope $\times 10$. L'échantillon contenant les billes à piéger repose sur une platine piezoélectrique de 1 nm de résolution en position. On regarde la bille en réflexion sur une caméra CCD. A droite, on voit une bille piégée par la pince optique (indiquée avec la flèche), on observe autour d'autres billes, qui ne sont pas dans le plan focal objet de l'objectif de microscope.

¹Les billes de silice sont en fait poreuses, ce qui explique un indice de réfraction aussi bas indiqué par le fournisseur

6.3 Description d'une expérience de pince optique en biologie.

Dans de nombreux cas, il est intéressant d'étudier les forces appliquées dans des systèmes biologiques. L'étude des forces internes au système se fait suivant le principe d'action / réaction. On va fixer une bille en un point du système, et la piéger à l'aide d'un laser. Une autre partie du système biologique est accrochée à point d'ancrage fixe. En déplaçant le piège par rapport à ce point d'ancrage, on va appliquer une force sur la bille, qui est d'une part maintenue par le système biologique, et d'autre part attirée vers le centre du piège. La bille va donc s'éloigner du centre du piège, et sa nouvelle position d'équilibre sera directement proportionnelle à la force exercée au sein du système biologique (voir Figure 6.5).

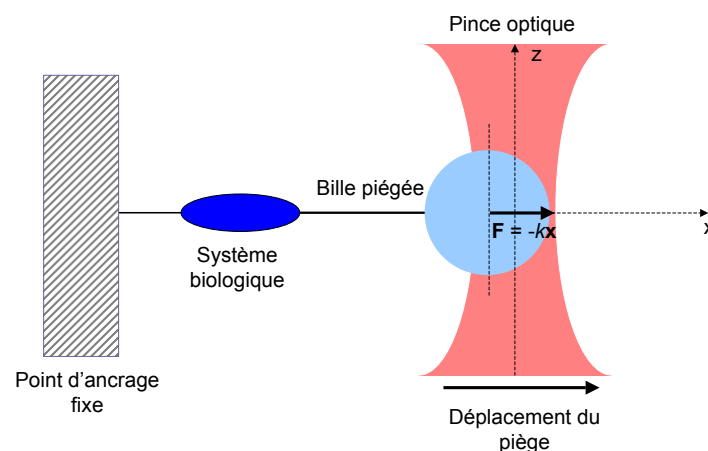


FIG. 6.5 – Schéma de principe de la mesure d'une force sur un système biologique à l'aide d'une pince optique. Une bille diélectrique micrométrique (en bleu ciel) est piégée par un faisceau laser fortement focalisé (en rouge). Cette bille est reliée au système biologique sur lequel on souhaite appliquer une force. Ce système biologique est lui-même attaché à un point d'ancrage fixe (qui peut être une autre bille, la surface de la lamelle de microscope...). Pour qu'une force soit appliquée, le piège est déplacé, et donc la bille aussi, car elle est retenue par le système biologique. Ce déplacement de la bille dans le piège crée une force de rappel F .

Le point d'ancrage peut être différent suivant les expériences. On peut choisir la lamelle de microscope, une autre bille piégée par une deuxième pince ou par une micropipette. Notre configuration utilise un objectif à immersion dans l'huile. La différence d'indice entre le verre et l'huile d'une part, et l'eau d'autre part est grande. Donc, si on focalise le laser de piège loin de l'interface verre/eau, la qualité du gradient d'intensité sera rapidement altérée par les aberrations sphériques. On se doit donc de piéger près de la surface. Donc nous allons utiliser la lamelle de microscope comme point d'ancrage. Comme le faisceau de piège est statique, la force sera appliquée en déplaçant l'échantillon, et donc le point d'ancrage, latéralement (orthogonalement par rapport au faisceau laser), grâce à une platine piezoélectrique NanoView 3 axes, Mad City Labs, qui a une précision en positionnement meilleure que le nanomètre.

Le piège créé ici est comparable à un piège harmonique, donc on peut écrire la force comme étant : $F = -k \cdot x$, k étant la raideur du piège, x le déplacement de la sphère par rapport à sa position d'origine. Afin de mesurer précisément une force, il faut donc pouvoir 1) remonter à la position de la bille dans le piège et 2) connaître la raideur du piège.

6.4 Détection de la position de la bille.

6.4.1 Dispositif expérimental.

Plusieurs montages de détection ont été réalisés pour observer la bille et ainsi caractériser la force appliquée par la pince optique sur la bille. On souhaite observer ici le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre dans le piège, ainsi que mesurer la raideur du piège afin d'évaluer la force appliquée au système biologique. La méthode la plus performante, et celle qu'on utilise, consiste à imager le plan focal image de l'objectif sur une photodiode à 4 quadrants. Cette photodiode est disposée de telle sorte que le déplacement du faisceau avec la bille n'induit pas de déplacement de l'image sur la photodiode, mais qu'un déplacement de la bille par rapport au piège induit un déplacement de l'image sur la photodiode, comme on peut le voir sur la Figure 6.6 [71]. La bille, piégée légèrement au dessus du plan focal image de l'objectif, se comporte grossièrement comme une lentille boule qui recollimate le faisceau de piégeage. Un condenseur à grande ouverture numérique (1,40 dans notre cas) va collecter les photons transmis par la bille, et fait l'image du plan focal image de l'objectif sur une photodiode à 4 quadrants.

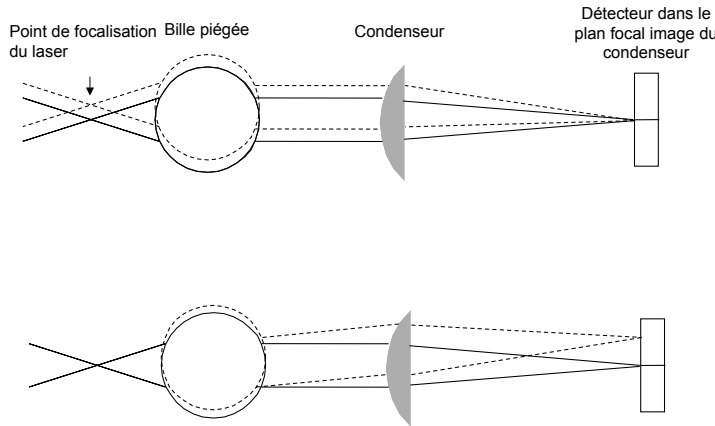


FIG. 6.6 – Représentation des trajets des faisceaux optiques avec le détecteur placé dans le plan focal arrière du condenseur. Une bille parfaitement piégée correspond à un spot centré sur la photodiode. En bas, est représenté l'effet d'un mouvement de la bille dans le piège (en pointillés). Le spot est décalé sur la photodiode. En haut, on montre qu'un mouvement simultané de la bille et du piège ne provoque pas de décalage du spot sur la photodiode.

Il est nécessaire d'avoir un condenseur à grande ouverture numérique pour collecter les fréquences spatiales élevées du faisceau après transmission de la bille.

6.4.2 Résolution spatiale.

La position de la bille dans le piège est déterminée par le déplacement du faisceau sur la photodiode à 4 quadrants.

On mesure ce déplacement en faisant la différence des tensions issues des quadrants 2 par 2, normalisée par la tension totale issue des 4 quadrants (Figure 6.7).

Il faut prévoir que la réponse de la photodiode n'est pas linéaire sur l'ensemble de sa surface, donc le diamètre du faisceau sur la photodiode ne doit pas excéder la moitié du diamètre de la photodiode. Dans l'article de M. W. Allersma *et al.* [71], les auteurs ont calculé la réponse absolue de la photodiode par rapport aux paramètres du faisceau laser à la sortie de l'objectif :

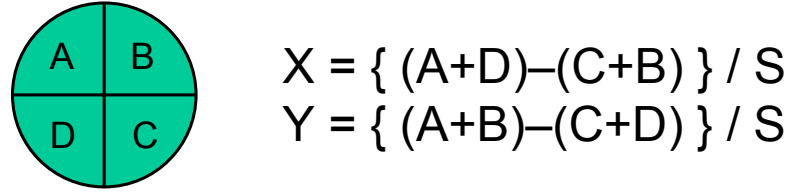


FIG. 6.7 – Schéma de la photodiode à 4 quadrants, avec la mesure du déplacement du faisceau sur la photodiode en x et en y .

$$\frac{I_+ - I_-}{I_+ + I_-} \cong \frac{16}{\sqrt{\pi}} \frac{k\alpha}{w_0^2} (x/w_0) e^{-(x/w_0)^2} \quad (6.3)$$

α est la susceptibilité diélectrique de la bille, qui s'exprime comme :

$$\alpha = n_m(a)^3 \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}$$

avec I_+ la somme des photocourants issus de deux quadrants du même côté, I_- la somme des photocourants issus des deux quadrants du côté opposé, w_0 la largeur du faisceau laser dans le plan focal image de l'objectif, k le nombre d'onde, x le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre dans le piège. On fait ici l'approximation que la bille se situe au niveau du plan de focalisation du faisceau laser. Si on désire avoir une résolution spatiale de 1 nm avec une bille de polystyrène ($n = 1,57$) de $0,5 \mu\text{m}$, un objectif d'ouverture numérique de 1,45 et un faisceau piège à 1064 nm, il faut être capable de mesurer une différence d'intensité relative de : $\Delta I/I = 1,1 \cdot 10^{-3}$. Ce calcul est valable sur la partie linéaire de la fonction exprimée dans l'équation 6.4.2, c'est-à-dire pour un déplacement latéral de la bille d'environ 100 nm de chaque côté de sa position d'équilibre dans le piège (Figure 6.8).

Limite de résolution due à la carte d'acquisition. La carte d'acquisition que nous utilisons (NI PCI-4474, National Instruments) derrière l'électronique de conversion courant-tension de la photodiode à 4 quadrants est une carte 24 bits avec 4 voies, chacune de ces voies ayant une bande passante de 45 kHz. La tension maximale acceptable à l'entrée de chaque voie est de ± 10 V. Un boîtier électronique bas bruit réalisé par Frédéric Moron convertit les photo-courants issus des 4 voies de la photodiode en tensions. La limite de résolution provient de la conversion analogique/numérique ($= 20\text{V}/2^{24}$), soit $1,2 \mu\text{V}$. Sauf si on envoie une puissance totale très faible sur la caméra, la résolution électronique ne nous limitera pas pour mesurer un $\Delta I/I = 1,1 \cdot 10^{-3}$, ce qui représente une tension de 11 mV dans le cas où le signal maximal de la photodiode est de 10 V par voie.

Il faudra aussi veiller à ce que l'intensité incidente sur chaque quadrant soit suffisamment grande pour que la plage de tension acceptée par la carte d'acquisition soit bien exploitée, ce, afin d'optimiser le rapport signal à bruit.

6.5 Description du mouvement de la bille dans le piège

La bille micrométrique est dans un solvant (de l'eau typiquement), piégée par la pince optique. Donc on aura un mouvement brownien dans un piège harmonique. L'équation du mouvement de la bille suit l'équation de Langevin suivante (écrite à une dimension pour simplifier) :

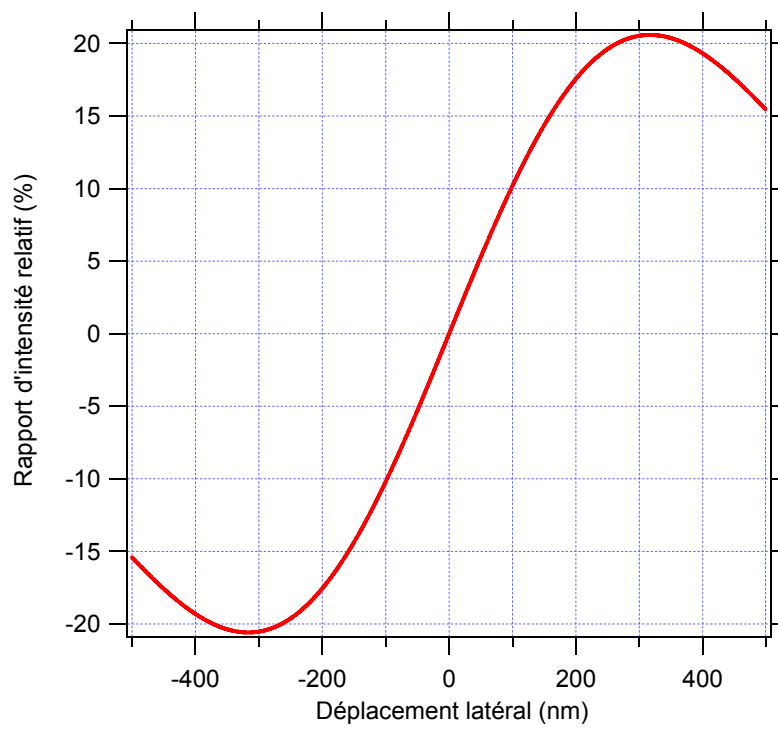


FIG. 6.8 – Graphique représentant le rapport d'intensité des photocourants à la sortie de la photodiode (%) en fonction du déplacement de la bille dans le piège par rapport à sa position d'équilibre (d'après l'équation 6.4.2).

$$m \frac{d^2 x(t)}{dt^2} + \beta \frac{dx(t)}{dt} + kx(t) = (2k_B T \beta)^{1/2} \alpha(t) \quad (6.4)$$

avec $x(t)$ la trajectoire du mouvement brownien de bille dans le piège, β le coefficient de traînée de la bille, $kx(t)$ la force de rappel du piège harmonique, et $(2k_B T \beta)^{1/2} \alpha(t)$ est un processus gaussien aléatoire qui représente la force brownienne pour une température absolue T ; pour tous t et t' , on a :

$$\begin{aligned} \langle \alpha(t) \rangle &= 0 \\ \langle \alpha(t) \alpha(t') \rangle &= \delta(t - t') \end{aligned}$$

Le coefficient de traînée est $\beta = 6\pi\eta a$, avec η la viscosité du solvant et a le rayon de la bille.

On peut simplifier l'expression 6.5 en supprimant les termes d'inertie, car ils se dissipent beaucoup plus vite que la vitesse à laquelle on est capable d'acquérir les données (45kHz maximal). Donc l'équation de Langevin devient :

$$\frac{dx(t)}{dt} + 2\pi f_c x(t) = (2D)^{1/2} \alpha(t) \quad (6.5)$$

avec la fréquence de coupure du piège $f_c = k/(2\pi\beta)$ et la constante de diffusion $D = k_B T \beta$. Après avoir enregistré $x(t)$ pendant T_{msr} , on fait la transformée de Fourier de $x(t)$ et de $\alpha(t)$:

$$\begin{aligned} \tilde{x}(f) &= \int_{-T_{msr}/2}^{T_{msr}/2} dt e^{i2\pi ft} x(t) \\ \text{avec } f &\equiv n/T_{msr}, n \text{ un entier naturel.} \end{aligned}$$

On trouve une solution à l'équation 6.5 :

$$\tilde{x}(f) = \frac{(2D)^{1/2} \tilde{\alpha}_k}{f_c - if} \quad (6.6)$$

Cela nous permet de remonter à la densité de puissance spectrale $P(f)$:

$$P(f) = \frac{\langle |\tilde{x}(f)|^2 \rangle}{T_{msr}} = \frac{D}{2\pi^2(f^2 + f_c^2)} \quad (6.7)$$

Ainsi, la densité de puissance spectrale est une lorentzienne, dans le cas du mouvement brownien d'une bille dans un piège harmonique. On verra par la suite que la fréquence de coupure du piège nous permettra de remonter à la raideur du piège et d'autres paramètres intéressants.

6.6 Détermination de la force appliquée.

Pour déterminer la force, il va falloir caractériser deux paramètres : le déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre dans le piège et la raideur k . Pour effectuer la calibration de la raideur du piège optique, nous utilisons le programme développé sous Matlab par Kirstin Berg-Sorensen [72, 73]. Depuis sa parution, ce programme a été cité pour la qualité du traitement des données qu'il réalise [74].

6.6.1 Caractérisation du déplacement de la bille dans le piège.

Déplacement latéral.

Pour calibrer les différences de tensions obtenues aux bornes de la photodiode en fonction du déplacement de la bille dans le piège, la méthode est assez directe. Elle consiste à coller sur la lamelle de microscope la bille piégée. Ensuite, on déplace la bille par rapport au faisceau laser à l'aide de la platine piezoélectrique. On observe le déplacement du faisceau sur la photodiode. Comme on connaît le déplacement de la platine à mieux qu'un nanomètre, on peut calibrer la réponse de la photodiode en volt par nanomètre de déplacement de la bille dans le piège. On obtient ainsi dans notre cas, sur la zone linéaire de la réponse de la photodiode, 18 mV/nm.

Cette méthode a pour inconvénient qu'il est difficile de coller la bille au niveau de son point d'équilibre dans le faisceau laser. En effet, en descendant la bille pour la coller, on peut rapidement faire une erreur importante en continuant à descendre l'objectif de microscope (et donc le plan focal image de l'objectif) alors que la bille est déjà collée à la surface. On doit donc faire attention à garder la position axiale du faisceau au même niveau (par rapport à la bille) avant collage à la surface et après collage. Cela peut nécessiter une calibration de la réponse de la photodiode pour un déplacement latéral du piège par rapport à la bille, cela à différentes profondeurs dans l'échantillon. Il faut aussi faire attention à ce que la bille soit bien collée à la surface, et qu'elle n'oscille pas autour d'une position d'équilibre sur la surface. Cette calibration se fait sur plusieurs allers-retours. Il faut prendre garde à rester à une fréquence d'allers-retours faible, autour du Hertz, car la platine peut entraîner des artefacts.

Distance de la bille à la surface.

Il nous faut connaître précisément la position de la bille par rapport à la surface lors de l'expérience, en particulier si l'ancrage est sur la surface. En effet, si on ne connaît pas précisément cette distance, on aura une valeur de la force modulée par le cosinus de l'angle formé par la molécule avec la surface (Figure 6.9).

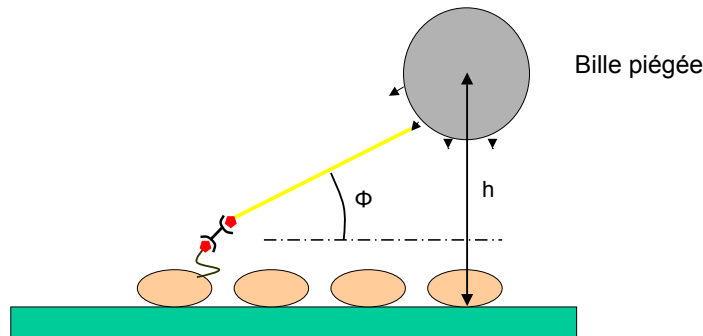


FIG. 6.9 – Schéma de bille piégée, accrochée via le système biologique à la surface. Le déplacement latéral, pour appliquer une force, provoque un angle dépendant de la distance h de la bille à la surface.

Pour connaître la distance h entre le centre de la bille (rayon a) et la surface, on utilise la loi de Faxén, qui nous donne la valeur du coefficient de traînée β de la bille dans le milieu (eau) suivant sa distance à la surface. Ce coefficient évolue drastiquement à la proximité de la surface, et nous permet de remonter à la hauteur [74]. On l'écrit :

$$\beta = \frac{6\pi\eta a}{1 - \frac{9}{16} \frac{a}{h} + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h}\right)^5} \quad (6.8)$$

avec η la viscosité du liquide. $6\pi\eta a$ est le coefficient de traînée d'une bille de rayon a loin de la surface, noté β_0 .

Des corrections ont été appliquées à la loi de Faxen, ce qui permet d'avoir une résolution sur la distance à la surface qui passe de 10 % à 1 % [72].

6.6.2 Caractérisation de la raideur du piège.

Pour calibrer la raideur du piège, nous allons observer sur la photodiode le mouvement brownien d'une bille sans accroche dans le piège. La densité spectrale de puissance du mouvement brownien va nous permettre de remonter à la raideur, via la fréquence de coupure du piège.

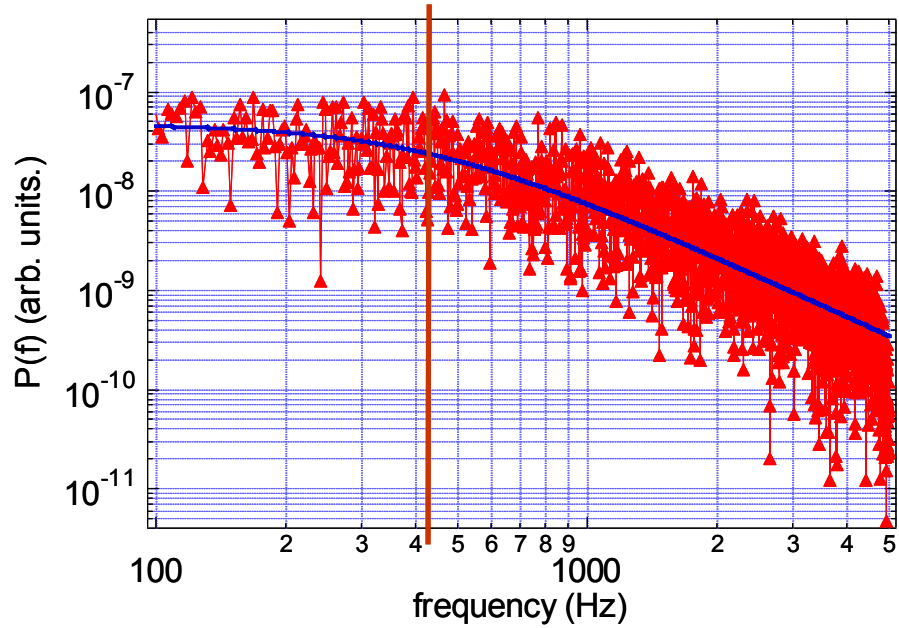


FIG. 6.10 – Densité spectrale de puissance de la position de la bille pour une puissance laser de 100 mW à l'entrée du microscope, avec une bille de silice de $1 \mu\text{m}$. Elle est ajustée avec la fonction définie en 6.5. Le trait vertical désigne la fréquence de coupure f_c , égale à 430 Hz.

La Figure 6.10 nous donne la densité spectrale de puissance d'une bille de silice de $1 \mu\text{m}$ piégée par la pince optique avec une puissance laser de 100 mW à l'entrée du microscope. Pour obtenir une fréquence de coupure fiable, il faut effectuer un grand nombre de mesures (typiquement 2^{16}) à une fréquence d'échantillonnage largement supérieure à la fréquence de coupure du piège. Ici, la fréquence de coupure à 3 dB de ce piège est de 430 Hz. Or, cette fréquence de coupure s'exprime :

$$f_c = \frac{k}{2\pi\beta} \quad (6.9)$$

Nous avons ici la raideur du piège k qui dépend de la fréquence de coupure de la bille dans le piège, mais aussi du coefficient de traînée de la bille. Or, lorsque la bille se situe près de la surface, ce coefficient peut être délicat à déterminer.

Il existe une autre méthode qui permet de se passer de la mesure de β , c'est la méthode utilisant le théorème d'équipartition. A une dimension, celui-ci s'exprime :

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k \langle x^2 \rangle \quad (6.10)$$

Dans cette expression, on peut déterminer la raideur k sans avoir à connaître le coefficient de traînée. Dans le cas de la Figure 6.10, la raideur déterminée par cette méthode nous donne $k = 0,025$ pN/nm.

De plus, on peut utiliser cette technique pour déterminer indirectement la hauteur de la bille par rapport à la surface. Pour cela il faut mesurer la fréquence de coupure du piège à différentes hauteurs dans la solution (d'abord éloigné de la surface, puis en se rapprochant), et pour chaque hauteur, déterminer la raideur du piège grâce au théorème d'équipartition. D'après les équations 6.6.2 et 6.6.2, on peut calculer le coefficient de traînée pour obtenir avec l'équation 6.6.1 la hauteur à la surface.

En dehors de déterminer la hauteur à la surface, la densité spectrale de puissance permet aussi de vérifier s'il n'y a pas de sources extérieures de bruit, ou si le piège est de bonne qualité, car autrement, on ne pourra l'ajuster avec une lorentzienne.

6.7 Expérience de biophysique.

Nous avons réalisé une expérience préliminaire, dans laquelle nous avons piégé une bille fixée à la surface via un double brin d'ADN. On a appliqué une tension sinusoïdale à la platine piezoélectrique, et nous avons estimé grossièrement la force appliquée, car nous n'avons pas la hauteur de la bille à la surface.

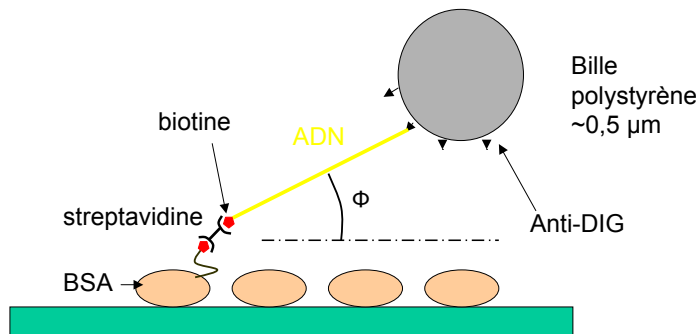


FIG. 6.11 – Schéma de l'expérience de mesure de force appliquée à un double-brin d'ADN.

La bille est fonctionnalisée anti-DIG (DIG : digoxygénine), l'ADN est marqué DIG à une extrémité et biotine à l'autre extrémité. L'ancrage de l'ADN se fait à la surface de la lamelle de microscope (Figure 6.11). On regarde ensuite le signal (en Volt) mesuré sur la photodiode par rapport au déplacement de la platine (micron).

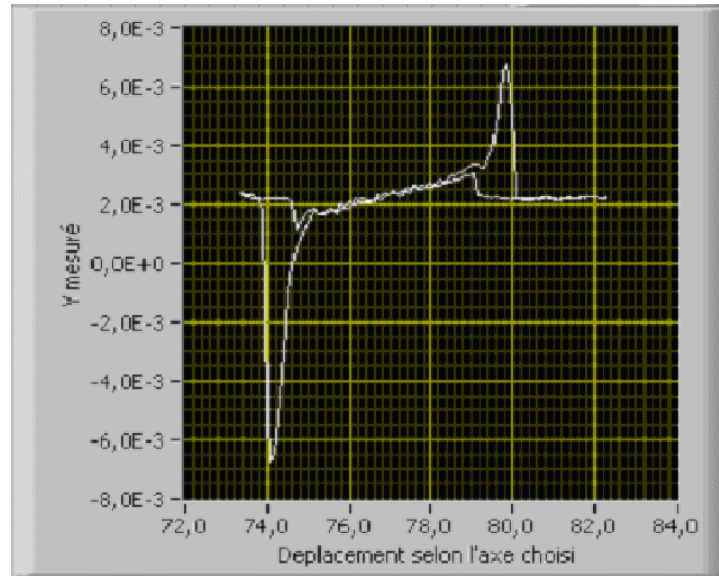


FIG. 6.12 – Réponse de la photodiode sur une période de la tension sinusoïdale appliquée à la platine piézoélectrique. L'ordonnée est en Volt et l'abscisse est en micron.

Sur la Figure 6.12, on remarque deux comportements. Sur chaque extrémité, la courbe présente une forte pente, qui est due à une forte déflexion du faisceau laser par la bille, donc à la bille qui sort du piège. Les traces aller et retour sont légèrement décalées aux extrémités car il est plus difficile de piéger que de dé-piéger, donc il faut que le faisceau soit plus près de la bille pour la piéger. Au centre, on a un plateau, correspondant à la zone où le brin d'ADN n'est pas étiré, donc il n'y a pas de force appliquée à la bille car elle est à sa position d'équilibre dans le piège. Le plateau n'est pas plat, cela peut être dû à un problème d'alignement du faisceau sur la photodiode. On a mesuré une force maximale appliquée de 12 pN environ, avec une réponse de la photodiode de 18 mV/nm, une différence maximale de tension de 8 mV à la sortie de la photodiode, et un piège de raideur $k = 2,66 \cdot 10^{-2}$ N/m.

6.8 Conclusion.

Cette expérience est très préliminaire, et l'évaluation de la force appliquée réalisée ici n'est que très approximative. Ce montage nécessite beaucoup d'amélioration pour réaliser dans le futur des expériences quantitatives. Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons développé la mécanique et le banc de mesure de force, mais nous n'avons pas eu le temps de l'améliorer pour atteindre la résolution souhaitable pour mesurer l'ouverture de structure secondaire de l'ARNm. Comme ce dispositif de pince optique est réalisé sur le même montage que la microscopie de fluorescence, il sera possible plus tard de combiner pince optique et microscopie de fluorescence. Ceci peut être intéressant dans l'étude du ribosome marqué QD, car comme le QD ne photoblanchit pas, il n'est pas détérioré par le laser de pince, comme c'est le cas pour les fluorophores organiques.

Conclusion générale.

Mon travail de thèse s'est déroulé en collaboration entre deux équipes : celle de D. Fourmy et S. Yoshizawa de l'ICSN, spécialistes du ribosome et de la traduction, et l'équipe biophotonique du groupe d'optique atomique du LCFIO, qui s'attache à mettre au point des dispositifs optiques pour étudier des systèmes biologiques à l'échelle de la molécule unique.

Pour mener à bien ces projets complexes à l'interface entre différentes disciplines, il faut parvenir à mettre en commun les compétences propres de chacun. La mise au point de l'échantillon contenant le système biologique à étudier en est l'illustration la plus frappante. Il faut tout d'abord disposer des différentes biomolécules, si besoin les synthétiser, les marquer. Il faut bien sûr savoir observer et interpréter les signaux de molécules uniques. Mais il faut surtout parvenir à faire fonctionner le système biologique dans les conditions compatibles avec les techniques optiques.

C'est à cette jonction que s'est situé mon travail de thèse. J'ai tout d'abord travaillé sur le dispositif optique et très rapidement, j'ai été amené à développer des méthodes nouvelles ou inspirées de la littérature, pour faire fonctionner un ribosome sur une lamelle de microscope. Ce travail de longue haleine a bien sûr fait appel aux compétences "historiques" de chaque groupe. Mais il a aussi fallu se familiariser avec des techniques de chimie de surface notamment qui ne faisaient a priori pas partie de notre culture scientifique. J'ai aussi participé au marquage des molécules biologiques pour que les modifications soient en adéquation avec les contraintes optiques. Le savoir-faire que j'ai acquis au contact des biologistes m'a permis d'importer dans le laboratoire d'optique la fabrication des échantillons biologiques et ainsi de pouvoir réaliser certaines étapes clés juste avant l'observation optique. C'est ce travail qui a été décrit dans ce manuscrit.

Dans un premier temps, nous avons amélioré le dispositif de microscopie de fluorescence en TIRFM. Pour les besoins du suivi de la traduction via des acides aminés marqués, nous avons été amenés à caractériser l'intensité de fluorescence du Bodipy-FL, pour une intensité d'excitation donnée. Nous avons donc étudié l'influence de la polarisation du laser d'excitation et déterminé la meilleure façon d'exciter le Bodipy FL en TIRFM. Nous avons ensuite écrit un programme d'analyse de données pour connaître précisément les propriétés d'émission de chaque Bodipy FL. Toutes ces étapes nous ont permis de réaliser une étude de la photophysique du Bodipy FL, avec une caractérisation de sa durée de vie et son intensité de saturation dans différentes conditions. Le Bodipy-FL photoblanchit rapidement dans des tampons classiques. Nous avons donc mis au point un système couplant une espèce chimique oxydante et une réductrice, appelé ROXS, qui, combiné avec un système enzymatique déplaçant la solution en oxygène, permet d'augmenter considérablement la durée de vie du Bodipy FL. Cela nous a permis de mieux estimer l'intensité de saturation car avec ROXS, la durée de vie des Bodipy FL

est plus longue que la durée de l'acquisition, ce qui n'était pas le cas dans un tampon classique.

Des améliorations sont encore à apporter sur le système ROXS, car on n'a pas complètement stabilisé la fluorescence du Bodipy FL, il subsiste un clignotement résiduel. La grande durée de vie observée nous permet de pouvoir compter les Bodipy FL lorsque que plusieurs sont situés sur la même tache dont la taille est limitée par diffraction. Evidemment, la compréhension que nous avons maintenant du ROXS nous permet de l'appliquer à d'autres fluorophores organiques pour d'autres tests. Il serait intéressant d'appliquer le système ROXS au ribosome, pour vérifier si ses composants n'altèrent pas son activité. A priori, cela ne devrait pas poser de problèmes, P. Tinnefeld estimant que de nombreux systèmes biologiques sont compatibles avec le ROXS [42].

Comme nous avons choisi de travailler en TIRFM, il nous a fallu développer une fonctionnalisation de surface adaptée à notre expérience biologique pour accrocher spécifiquement le ribosome à la surface. En effet, l'utilisation de différentes espèces biologiques marquées avec un fluorophore et la colocalisation de ces espèces via les marqueurs fluorescents posent le problème de la spécificité des interactions. La complexité du ribosome, composé d'ARN et de protéines, et l'utilisation d'acides aminés marqués ont rendu cette fonctionnalisation longue et difficile à réaliser. En parallèle, le développement d'une cellule microfluidique nous a permis d'avoir un système fiable pour l'étude la traduction. Ces étapes sont maintenant parfaitement maîtrisées, et quand des problèmes d'interactions non spécifiques apparaissent, on remarque souvent que cela est dû à la qualité aléatoire des produits qu'on reçoit des fournisseurs.

Deux principales améliorations restent à apporter. La première devrait être de trouver une chimie de surface alternative à la silanisation car le produit qu'on utilise actuellement augmente le fond de fluorescence, particulièrement dans le spectre d'émission du Bodipy FL. Une étude en collaboration pourrait être envisageable afin de remédier à ce problème. La seconde amélioration concerne la microfluidique. Il serait intéressant de diminuer le volume mort, en diminuant le diamètre des tuyaux et en passant à des connecteurs sans volume mort. Cela évidemment nous demanderait de passer à un système plus complexe que le nôtre. A la fin de ma thèse, nous avons commencé à utiliser des capillaires et des connectiques fournis par Upchurch Scientific. Un peu de travail reste à accomplir, mais cette solution semble excellente, et diviserait au moins par 5 le volume mort de notre système microfluidique.

Pour observer le ribosome, nous avons développé une méthode de marquage originale, avec une étiquette GST sur une protéine ribosomale, ciblée par un anticorps anti-GST. On a montré qu'ainsi, on pouvait marquer spécifiquement des ribosomes avec des QD fonctionnalisés anti-GST, et que ces ribosomes étaient toujours actifs en solution. Nous avons montré qu'on pouvait fixer des ribosomes marqués QD de manière très spécifique à la surface. Les diverses tentatives de traduction avec des ribosomes marqués QD nous ont donné plusieurs preuves indirectes de l'activité de ces ribosomes marqués sur la lamelle. La dernière expérience, montrant le décrochage du ribosome-QD de l'ARNm en fin de traduction laisse penser que les ribosomes-QD sont actifs sur une surface, et sont capables de faire plusieurs cycles d'élongation, même s'il nous manque encore une preuve irréfutable.

De nombreux tests restent à effectuer pour observer l'activité traductionnelle du ribosome. Les diverses preuves indirectes nous permettent de penser que l'activité de ribosomes marqués QD sera bientôt observée. Nous sommes actuellement en train de synthétiser un ARNm de GFP ayant une durée de maturation très courte (environ 5 minutes), ce qui permettra de colocaliser les QD et les GFP synthétisées. L'expérience proposée en fin du chapitre sur l'étude des ribosomes en molécules uniques (avec un double-brin marqué

avec un ATTO 647N) devrait aboutir, mais il reste une difficulté majeure, celle d'avoir les conditions de traduction optimales, permettant la synthèse complète d'une protéine. Ce problème est assez ardu, et pour le moment, seul un groupe y est parvenu [21]. Autrement, d'autres expériences devraient être réalisables avec des extraits cellulaires, mais on ne pourrait alors plus utiliser les acides aminés marqués Bodipy FL. En effet, il en faudrait une telle concentration qu'on serait incapable de faire une observation en TIRFM à cause du fond de fluorescence issu des Bodipy FL diffusant dans le champ évanescent. Deux solutions pourraient être intéressantes pour observer le décalage de phase de lecture, mais elles demandent toutes deux un effort considérable. Une première possibilité est de garder les acides aminés marqués Bodipy FL, mais de changer la conception de notre système de microscopie de fluorescence pour échanger la lamelle contre une surface nanostructurée (appelée "Zero Mode Waveguides"). La fabrication de ces systèmes, mais aussi la fonctionnalisation de la surface qui s'en suit, vont demander beaucoup de travail de mise au point. Une autre solution serait d'abandonner les acides aminés marqués Bodipy FL, et de faire du smFRET en marquant le ribosome et l'ARNm. Ainsi, on pourrait travailler avec un extrait cellulaire, et on n'aurait plus de problème de concentration en acides aminés marqués. Ici, marquer le ribosome spécifiquement et développer une expérience de smFRET seront les parties délicates du projet.

Enfin, nous avons commencé à mettre au point un dispositif de piégeage optique. Il devra être grandement amélioré pour permettre l'observation du dépliement de structures secondaires de l'ARNm. Il reste beaucoup de travail pour supprimer les sources de bruits et avoir la résolution nécessaire pour réaliser le projet initial, c'est-à-dire déplier la tige-boucle SECIS. En effet, une fois cette tige-boucle dépliée, la taille du brin d'ARNm augmente de 7 nm seulement, ce qui est très difficile à observer en pince optique.

Bibliographie

- [1] G. E. Palade. A small particulate component of the cytoplasm. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 1(1) :59–68, January 1955. (pages 9 et 13)
- [2] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, and H. F. Noller. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, 292(5518) :883–896, May 2001. (page 9)
- [3] V. Ramakrishnan. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell, Review*, 108 :557–572, February 2002. (pages 13, 16, 17, 18 et 22)
- [4] A. Korostelev and H. F. Noller. The ribosome in focus : new structures bring new insights. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(9) :434–441, september 2007. (pages 13 et 22)
- [5] T. A. Steitz. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 9 :242–253, March 2008. (pages 13 et 22)
- [6] M. Selmer, C. M. Dunham, F. V. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, and V. Ramakrishnan. Structure of the 70s ribosome complexed with mrna and trna. *Science*, 313 :1935–1942, 2006. (page 14)
- [7] M. A. Borovinskaya, R. D. Pai, W. Zhang, B. S. Schuwirth, J. M. Holton, G. Hirokawa, H. Kaji, A. Kaji, and J. H. Doudna Cate. Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(8) :727–732, August 2007. (page 19)
- [8] A. Weixlbaumer, S. Petry, C. M. Dunham, M. Selmer, A. C. Kelley, and V. Ramakrishnan. Crystal structure of the ribosome recycling factor bound to the ribosome. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(8) :727–732, August 2007. (page 19)
- [9] J. D. Watson and F. Crick. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 :737–738, April 1953. (page 19)
- [10] R. P. Feynman. There’s plenty of room at the bottom. *J. Microelectromech. Syst.*, 1 :60–66, 1992. (page 19)
- [11] T. Ha, Th. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, and S. Weiss. Probing the interaction between two single molecules : Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93 :6264–6268, 1996. (page 19)
- [12] K. Svoboda and S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23 :247, 1994. (pages 21 et 126)
- [13] P. Selvin and T. Ha. *Single-Molecule Techniques : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. (page 21)
- [14] A. Sytnik, S. Vladimirov, Y. Jia, L. Li, B. S. Cooperman, and R. M. Hochstrasser. Peptidyl transferase center activity observed in single ribosomes. *Journal of Molecular Biology*, 285 :49–54, 1999. (pages 22, 23 et 24)
- [15] F. Vanzi, S. Vladimirov, C. R. Knudsen, Y. E. Goldman, and B. S. Cooperman. Protein synthesis by single ribosomes. *RNA*, 9 :1174–1179, 2003. (page 22)

- [16] R. Stapulionis, Y. Wang, G. T. Dempsey, R. Khudaravalli, K. M. Nielsen, B. S. Cooperman, Y. Goldman, and C. R. Knudsen. Fast *in vitro* translation system immobilized on a surface via specific biotinylation of the ribosome. *Biological Chemistry*, 389 :1239–1249, September 2008. (pages 22, 97, 103 et 111)
- [17] S. C. Blanchard, H. D. Kim, R. L. Gonzalez Jr, J. D. Puglisi, and S. Chu. tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(35) :12893–12898, August 2004. (pages 22, 24, 25, 86, 90 et 93)
- [18] J. B. Munro, R. B. Altman, N. O'Connor, and S. C. Blanchard. Identification of two distinct hybrid state intermediates on the ribosome. *Molecular Cell*, 25 :505–517, 2007. (pages 22, 24, 26 et 90)
- [19] P. V. Cornish, D. N Ermolenko, H. F. Noller, and T. Ha. Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes. *Molecular Cell*, 30 :578–588, June 2008. (pages 22, 24, 25 et 104)
- [20] R. A. Marshall, M. Dorywalska, and J. D. Puglisi. Irreversible chemical steps control intersubunit dynamics during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(40) :15364–15369, 2008. (pages 22, 24, 25 et 26)
- [21] J.-D. Wen, L. Lancaster, C. Hodges, A.-C. Zeri, S. H. Yoshimura, H. F. Noller, C. Bustamante, and I. Tinoco Jr. Following translation by single ribosomes one codon at a time. *Nature*, 452 :598–603, March 2008. (pages 22, 26, 27, 30, 116 et 142)
- [22] S. Uemura, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi, and T. Funatsu. Single-molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes. *Nucleic Acids Research*, 2008. (pages 22, 28, 29, 101 et 103)
- [23] A. Katranidis, D. Atta, R. Schlesinger, K. H. Nierhaus, T. Choli-Papadopolou, I. Gregor, M. Gerrits, G. Büldt, and J. Fitter. Fast biosynthesis of GFP molecules : A single-molecule fluorescence study. *Angewandte Chemie*, 48 :1758–1762, January 2009. (pages 22, 29, 103, 104, 105, 113, 114 et 119)
- [24] R. A. Marshall, C. E. Aitken, M. Dorywalska, and J. D. Puglisi. Translation at the single-molecule level. *Annual Review of Biochemistry*, 77 :177–203, 2008. (pages 22, 25, 34, 101 et 116)
- [25] S. C. Blanchard. Single-molecule observations of ribosome function. *Current Opinion in Structural Biology*, 19 :103–109, 2009. (page 22)
- [26] M. Karlsson, M. Y. Pavlov, M. Malmqvist, B. Persson, and M. Ehrenberg. Initiation of *Escherichia coli* ribosomes on matrix coupled mRNAs studied by optical biosensor technique. *Biochimie*, 81 :995–1002, 1999. (page 22)
- [27] J. Fei, P. Kosuri, D. D. MacDougall, and R. L. Gonzalez Jr. Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation. *Molecular Cell*, 30 :348–359, 2008. (pages 24, 25 et 26)
- [28] P. V. Cornish, D. N. Ermolenko, D. W. Staple, L. Hoang, R. P. Hickerson, H. F. Noller, and T. Ha. Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009. (pages 24 et 26)
- [29] R. A. Marshall, C. E. Aitken, and J. D. Puglisi. GTP hydrolysis by IF2 guides progression of the ribosome into elongation. *Molecular Cell*, 35 :37–47, July 2009. (page 24)
- [30] S. H. Sternberg, J. Fei, N. Prywes, K. A. McGrath, and R. L. Gonzalez Jr. Translation factors direct intrinsic ribosome dynamics during translation termination and ribosome recycling. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16 :861–868, August 2009. (page 24)

- [31] S. Uemura, M. Dorywalska, T.-H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu. Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome. *Nature*, 446 :454, March 2007. (pages 28, 101 et 102)
- [32] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1369–1377, November 2003. (page 33)
- [33] D. Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2 :764–774, 2001. (page 34)
- [34] S. Huet, E. Karatekin, V. S. Tran, I. Fanget, S. Cribier, and J.-P. Henry. Analysis of transient behavior in complex trajectories : Application to secretory vesicle dynamics. *Biophys. J.*, 91 :3542–3559, 2006. (page 35)
- [35] R. Roy, S. Hohng, and T. Ha. A practical guide to single-molecule FRET. *Nature Methods*, 5(6) :507–516, 2008. (page 35)
- [36] M. J. Lang, P. M. Fordyce, A. M. Engh, K. C. Neuman, and S. M. Block. Simultaneous, coincident optical trapping and single-molecule fluorescence. *Nature Methods*, 1(2) :1–7, November 2004. (page 35)
- [37] J. D. Jackson. *Electrodynamique Classique, troisième édition*. Dunod, 1999. (pages 39 et 41)
- [38] I. Rasnik, S. A. McKinney, and T. Ha. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nature Methods*, 2006. (pages 50, 55, 69 et 71)
- [39] C. E. Aitken, R. A. Marshall, and J. D. Puglisi. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophys. J.*, 94 :1826–1835, 2008. (pages 50, 55, 69, 70, 71 et 76)
- [40] R. Dave, D. S. Terry, J. B. Munro, and S. C. Blanchard. Mitigating unwanted photophysical processes for improved single-molecule fluorescence imaging. *Biophys. J.*, 96 :2371–2381, 2009. (pages 55 et 71)
- [41] T. Cordes, J. Vogelsang, and P. Tinnefeld. On the mechanism of trolox as antiblinking and antibleaching reagent. *Journal of the American Chemical Society communications*, March 2009. (pages 55 et 78)
- [42] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, and P. Tinnefeld. A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angewandte Chemie*, 47 :5465–5469, 2008. (pages 55, 71, 72, 73, 81, 122 et 141)
- [43] J. M. Turllet and L. Cognet. Cours de biophotonique. Technical report, Master 2 Recherche "Laser, Matière et Nanosciences", Université Bordeaux 1, 2006. (page 59)
- [44] R. Kasper, M. Heilemann, P. Tinnefeld, and M. Sauer. Towards ultra-stable fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy. *Proceeding of SPIE-OSA, Biophotonics 2007 : Optics in Life Science*, 6633, 2007. (page 64)
- [45] C. A. M. Seidel, A. Schultz, and M. H. M. Sauer. Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies. *Journal of Physical Chemistry*, 100 :5541–5553, February 1996. (page 64)
- [46] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base. *Analytical Sciences, The Japan Society for Analytical Chemistry*, 17 :155–160, January 2001. (pages 64 et 73)
- [47] W. E. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74(8) :3597–3619, August 2003. (page 68)

- [48] K. Perronet, P. Bouyer, N. Westbrook, N. Soler, D. Fourmy, and S. Yoshizawa. Single molecule fluorescence detection of bodipy-fl molecules for monitoring protein synthesis. *Journal of Luminescence*, 127(1) :264–268, november 2007. (pages 69 et 70)
- [49] D. Rehm and A. Weller. Kinetics of fluorescence quenching by electron and h-atom transfer. *Isr. J. Chem.*, 8 :259, 1970. (page 72)
- [50] R. Y. Lai and A. J. Bard. Electrogenerated chemiluminescence 71. photophysical, electrochemical, and electrogenerated chemiluminescent properties of selected dipyrromethene-bf₂ dyes. *Journal of Physical Chemistry B*, 107 :5036–5042, April 2003. (page 73)
- [51] B. Hinkeldey, A. Schmitt, and G. Jung. Comparative photostability studies of bodipy and fluorescein dyes by using fluorescence correlation spectroscopy. *ChemPhysChem*, 9 :2019–2027, 2008. (page 81)
- [52] T. Ha, I. Rasnik, W. Cheng, H. P. Babcock, G. H. Gauss, T. M. Lohman, and S. Chu. Initiation and re-initiation of dna unwinding by the escherichia coli rep helicase. *Nature*, 419 :638–641, 2002. (page 86)
- [53] C. M. Halliwell and A. E. G. Cass. A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces. *Anal. Chem.*, 73(11) :2476–2483, June 2001. (page 86)
- [54] F. Enrichi, E. Trave, and M. Bersani. Acid synthesis of luminescent amine-functionalized or erbium-doped silica spheres for biological applications. *Journal of Fluorescence*, 18 :507–511, 2008. (page 87)
- [55] A. Crut, B. Geron-Landre, I. Bonnet, S. Bonneau, P. Desbiolles, and C. Escude. Detection of single dna molecules by multicolor quantum-dot end-labeling. *Nucleic Acids Research*, 33, May 2005. (page 93)
- [56] L. R. Brewer and P. R. Bianco. Laminar flow cells for single-molecule studies of dna-protein interactions. *Nature Methods*, 5(6) :517–525, June 2008. (page 94)
- [57] M. C. Noom, B. van den Broek, J. van Mameren, and G. J. L. Wuite. Visualizing single dna-bound proteins using dna as a scanning probe. *Nature Methods*, 4 :1031–1036, November 2007. (page 98)
- [58] T. Hohsaka, R. Abe, K. Shiraga, and M. Sisido. Incorporation of fluorescently labeled nonnatural amino acids into proteins in an e. coli in vitro translation system. *Nucleic Acids Research Supplement No. 3*, pages 271–272, 2003. (page 99)
- [59] G. Traverso, F. Diehl, R. Hurst, A. Shuber, D. Whitney, C. Johnson, B. Levin, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Multicolor in vitro translation. *Nature Biotechnology*, 21 :1093 – 1097, August 2003. (page 99)
- [60] M. Dorywalska, S. C. Blanchard, R. L. Gonzalez Jr, H. D. Kim, S. Chu, and J. D. Puglisi. Site-specific labeling of the ribosome for single-molecule spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 33(1) :182–189, 2005. (page 101)
- [61] J. Shine and L. Dalgarno. Peptide bond formation destabilizes shine-dalgarno interaction on the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 71 :1342–1346, 1974. (page 101)
- [62] Y. Wang, H. Qin, R. D. Kudaravalli, S. V. Kirillov, G. T. Dempsey, D. Pan, B. S. Cooperman, and Y. E. Goldman. Single-molecule structural dynamics of ef-g-ribosome interaction during translocation. *Biochemistry*, 46 :10767–10775, 2007. (page 103)
- [63] D. N. Ermolenko, Z. K. Majumdar, R. P. Hickerson, P. C. Spiegel, R. M. Clegg, and H. F. Noller. Observation of intersubunit movement of the ribosome in solution using fret. *Journal of Molecular Biology*, 370 :530–540, 2007. (pages 103 et 104)

- [64] D. N. Ermolenko, P. C. Spiegel, Z. K. Majumdar, R. P. Hickerson, R. M. Clegg, and H. F. Noller. The antibiotic viomycin traps the ribosome in an intermediate state of translocation. *Nature Structural Molecular Biology*, 14 :493–497, 2007. (page 103)
- [65] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289 :905–920, August 2000. (page 105)
- [66] J. D. Puglisi and J. R. Wyatt. Biochemical and nmr studies of rna conformation with an emphasis on rna pseudoknots. *Methods Enzymol.*, 261 :323–350, 1995. (page 112)
- [67] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 24(4) :156–159, January 1970. (page 126)
- [68] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11(5) :288–290, May 1986. (page 126)
- [69] A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer. Optical trapping of dielectric particles in arbitrary fields. *J. Opt. Soc. Am. A*, 18(4) :839–853, April 2001. (page 129)
- [70] A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer. Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations. *Applied Optics*, 41(13) :2494–2507, May 2004. (page 129)
- [71] M. W. Allersma, F. Gittes, M. J. deCastro, R. J. Stewart, and C. F. Schmidt. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophys. J.*, 74 :1074–1085, February 1998. (page 132)
- [72] K. Berg-Sorensen and H. Flyvbjerg. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Scient. Inst.*, 75(3) :594–612, March 2004. (pages 135 et 137)
- [73] I. M. Tolic-Norrelykke, K. Berg-Sorensen, and H. Flyvbjerg. Matlab program for precision calibration of optical tweezers. *Computer Physics Communications*, 159 :225–240, 2004. (page 135)
- [74] K. C. Neuman and S. M. Block. Optical trapping. *Rev. Scient. Inst.*, 75(9) :2787–2809, September 2004. (pages 135 et 136)

Résumé Dans ce mémoire sont présentées la conception et la réalisation d'une expérience portant sur l'étude en molécule unique de l'activité traductionnelle du ribosome procaryote. Pour ce faire, nous utilisons un ribosome et des acides aminés lysines marqués spécifiquement avec deux marqueurs fluorescents ayant des spectres d'émissions différents. Ainsi, nous pouvons colocaliser les ribosomes et les acides aminés incorporés en utilisant la microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRFM). Pour pouvoir compter les acides aminés incorporés, nous avons réalisé une étude en molécule unique des propriétés photophysiques du fluorophore organique les marquant, le Bodipy FL. Celui-ci a une faible durée de vie et clignote beaucoup. Afin de remédier à ces problèmes, nous avons développé un système permettant d'augmenter sa durée de vie d'un facteur 25 environ, et qui réduit le taux de clignotement pour de faibles intensités d'excitation. L'étude des ribosomes à proximité de la surface d'une lamelle de microscope nous a amenés à développer une chimie de surface n'autorisant qu'une accroche spécifique des espèces biologiques étudiées et conservant l'activité des ribosome. Ces études ont été réalisées à l'aide de cellules microfluidiques élaborées par nos soins permettant une grande flexibilité lors des expériences. Nous avons élaboré un marquage spécifique original du ribosome à l'aide d'un nanocristal semi-conducteur. Nous avons évalué la spécificité de l'accroche ainsi que l'activité du ribosome marqué en mesure d'ensemble. Nous avons ensuite observé l'activité de ces ribosomes marqués accrochés à une surface en molécule unique. Des expériences préliminaires en molécules uniques ont démontré que des ribosomes non marqués étaient capables d'incorporer les acides aminés marqués Bodipy FL. Enfin, nous présentons les premières étapes de conception d'une pince optique pour mesurer des forces de cohésion sur des structures particulières de l'ARN messager.

Mots-clés molécule unique, microscopie de fluorescence, chimie de surface, photoblanchiment, clignotement, ribosome, traduction, pince optique.

Abstract This thesis recounts the conception and the realisation of an experiment about the study at the single molecule level of the prokaryotic ribosome activity. To do that, we use ribosomes and amino acids labeled with two fluorescent probes which emit at two different wavelengths. Thus, we are able to co-localize the ribosomes and the incorporated amino acids by single molecule total internal reflexion fluorescence microscopy. In order to count the number of incorporated amino acids, we studied, at the single molecule level, the photophysical properties of their probe : the organic fluorophore Bodipy FL. We used a buffer containing an oxygen scavenger and two chemical reagents, one oxydising and one reducing, to increase the life-time, by a factor of 25, and the fluorescence stability in reducing the blinking at low laser excitation intensities. For the single molecule ribosome study, we developed a versatile microfluidic cell. The surface chemistry was carefully elaborated to eliminate non specific interactions between the surface and the biological reagents, and to preserve the ribosome activity. We incorporated a specific tag in the ribosome to label it with a semiconductor nanocrystal (QD). The activity of the ribosome labeled with a QD was observed in bulk experiment, then at the single molecule level. The Bodipy FL labeled amino acid incorporation by single ribosomes was also observed. Finally, we present the first steps of the conception of an optical tweezer to determine messenger RNA cohesion forces.

Key-words single molecule, fluorescence microscopy, surface chemistry, photobleaching, blinking, ribosome, translation, optical tweezers.