



HAL
open science

Imagerie des déclinis de fluorescence pour l'étude de la dynamique et des interactions de macromolécules en cellules vivantes

Marc Tramier

► **To cite this version:**

Marc Tramier. Imagerie des déclinis de fluorescence pour l'étude de la dynamique et des interactions de macromolécules en cellules vivantes. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2001. Français. NNT: . tel-00003477

HAL Id: tel-00003477

<https://theses.hal.science/tel-00003477>

Submitted on 3 Oct 2003

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.

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité :
Biophysique moléculaire

présentée par
Marc Tramier

pour obtenir le grade de **DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6**

Sujet de la thèse :

**Imagerie des déclins de fluorescence pour l'étude de la dynamique et
des interactions de macromolécules en cellules vivantes.**

soutenue le Vendredi 27 Avril 2001

devant le jury composé de :

M Paul Vigny (président)
Mme Fabienne Merola (rapporteur)
M Michel Robert-Nicoud (rapporteur)
M David M Jameson (examineur)
M Robert Pansu (examineur)
Mme Maité Coppey (directeur de thèse)

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire « Complexes macromoléculaires en cellules vivantes », à l'Institut Jacques Monod. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Maïté Coppey pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et confié ce passionnant sujet de thèse. Je la remercie chaleureusement pour m'avoir fait bénéficier de son expérience et de ses connaissances, et pour l'aide précieuse qu'elle m'a prodiguée tout au long de ce travail.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude au Professeur Paul Vigny pour m'avoir fait confiance au début de ce travail. Il a accepté de faire partie du jury de cette thèse et m'a fait l'honneur d'en être le président. Connaissant ses nombreuses occupations, je l'en remercie vivement.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Fabienne Merola et au Professeur Michel Robert-Nicoud pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, malgré leurs emplois du temps très chargés.

I would like to express my warmest thanks to Professor David Jameson for kindly agreeing to come all the way to Paris to be on my jury, even though the proceedings are in french. I also express my acknowledgments to his hospitality during my stay in his lab. I am grateful to him for stimulating teaching and fruitful advice.

Je remercie chaleureusement le Docteur Robert Pansu pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour son accueil au cours de certains travaux, pour les connaissances qu'il a su me transmettre et ses conseils tout au long de ce travail.

J'exprime également toute ma reconnaissance au Docteur Jérôme Mertz pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

I particularly express my warmest thanks to Doctor Klaus Kemnitz for providing me with his experience and his knowledge, and also for fruitful advice all along this work.

Je tiens également à remercier Patrick Denjean pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances et son expérience.

Je remercie chaleureusement le Docteur Isabelle Gautier pour le chemin parcouru ensemble, avec qui une partie du travail a été réalisé, et qui a toujours su me transmettre ses connaissances. J'exprime ma profonde reconnaissance au Docteur Christiane Durieux pour son expérience, ses connaissances et sa disponibilité, ainsi que pour son écoute dans les moments difficiles. Je voudrais tout spécialement remercier le Docteur Jacques Coppey pour ses conseils et ses encouragements tout au long de ce travail, ainsi que pour son ouverture d'esprit. Je remercie également le Docteur Marie-Jo Masse pour ses conseils précieux et Jean-Claude Mevel pour son soutien durant ce travail.

Je tiens à remercier Christian Hubert, le Docteur Vincent Mignotte, le Docteur Marc Hallier, Sylvie Ravalet et Tristan Piolot avec qui certaines parties de ce travail ont été effectuées, ainsi que le Docteur Christophe Antoniewsky, le Docteur Sophie Netter, le Docteur Natalie Taranenko, le Professeur Catherine Sautès, le Docteur Anshu Agarwal et Joël Cohen-Solal avec qui divers travaux en collaboration ont permis de forger mon expérience. Je leur exprime à tous individuellement ma reconnaissance pour leur contribution à ce travail.

Je voudrais également remercier le Professeur Jean-Claude Nicolas, le Professeur Enrico Gratton, le Docteur Jean-Claude Brochon, le Docteur Luis Baglattoli, Nathalie Désiré, Oliver Holub, John Croney, Gérard Géraud et Alain Pellegrina pour leurs diverses participations et les divers échanges relatifs à ce travail.

Je remercie Marie-Aline Hitier pour sa dernière relecture de ce manuscrit. Enfin, que tout ceux qui m'ont entouré et soutenu tout au long de ce travail trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance, de mon amitié ou encore pour d'autres de ces choses qu'on ne sait pas écrire.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	4
Résumé	10
Abstract	11
Abréviations	12
Chapitre I : Introduction générale	13
I. 1. Méthodes de fluorescence pour caractériser les complexes macromoléculaires	13
<i>I. 1. 1. Le FRET</i>	14
<i>I. 1. 2. L'anisotropie de fluorescence</i>	14
<i>I. 1. 3. Le FRAP</i>	15
<i>I. 1. 4. La FCS</i>	16
I. 2. Marquage endogène de protéines : la GFP	17
I. 3. Fluorescence et cellule vivante	20
Chapitre II : Théorie et modèles	24
II. 1. Fluorescence et durée de vie	24
<i>II. 1. 1. Diagramme de Perrin-Jablonski</i>	24
<i>II. 1. 2. Spectre d'absorption, d'émission et déplacement de Stokes</i>	25
<i>II. 1. 3. Rendement quantique</i>	27
<i>II. 1. 4. Extinction de fluorescence</i>	28
<i>II. 1. 5. Durée de vie de fluorescence</i>	29
II. 2. Transfert d'énergie de type Förster, le FRET	31
<i>II. 2. 1. Processus de désexcitation par FRET</i>	31
II. 2. 1. 1. Vitesse de transfert.....	31
II. 2. 1. 2. Efficacité de transfert.....	33
<i>II. 2. 2. Théorie de Förster</i>	33
<i>II. 2. 3. Mesure du FRET</i>	35
II. 2. 3. 1. Intensité de fluorescence.....	35
II. 2. 3. 2. Durée de vie du donneur.....	36
II. 2. 3. 3. Cinétique de fluorescence de l'accepteur.....	37
II. 2. 3. 4. Cinétique de photoblanchiment.....	38

II. 2. 4. Mesure, orientation, distance et FRET : la complexité de l'interprétation	38
II. 2. 4. 1. Effet des variations de concentration sur les mesures.....	38
II. 2. 4. 2. Effet des variations de pourcentage du donneur en interaction sur les mesures.....	40
II. 2. 4. 3. Autofluorescence cellulaire.....	41
II. 2. 4. 4. Le facteur d'orientation comme limitation de la mesure de distance.....	43
II. 3. Dépolarisation de la fluorescence émise, déclin d'anisotropie	43
II. 3. 1. Anisotropie et photosélection des fluorophores à l'excitation	43
II. 3. 2. Déclins d'anisotropie	46
II. 3. 3. Effet de la diffusion rotationnelle sur l'anisotropie	47
II. 3. 4. Effet du FRET entre chromophores identiques, l'homoFRET, sur l'anisotropie	49
II. 3. 5. Macromolécules déformables : effet de la dynamique torsionnelle de l'ADN sur l'anisotropie d'un intercalant	52
Chapitre III : Technique et technologies	56
III. 1. Le comptage de photons uniques corrélé en temps	57
III. 1. 1. Principe	57
III. 1. 2. L'excitation	59
III. 1. 3. La détection	61
III. 1. 4. L'acquisition	64
III. 2. Descriptif des montages	67
III. 2. 1. Détection confocale	68
III. 2. 2. Détection par le détecteur Delay-line	70
III. 3. Analyse des données	72
III. 3. 1. Algorithme d'ajustement par la méthode des moindres carrés	73
III. 3. 2. Analyse globale pour le DL	74
Chapitre IV : Mise au point, développements et caractérisation des sondes fluorescentes en cellules vivantes	76
IV. 1. Développements technologiques	76
IV. 1. 1. Caractérisation du système DL	76
IV. 1. 1. 1. Illumination laser plein champ.....	77

IV. 1. 1. 2. Optimisation de la réponse temporelle.....	79
IV. 1. 1. 3. Bruit et rapport signal/bruit.....	82
IV. 1. 1. 4. Calibration spatiale.....	83
IV. 1. 1. 5. Calibration temporelle.....	85
IV. 1. 1. 6. Validation de la mesure de durée de vie.....	87
IV. 1. 2. L'anisotropie de fluorescence sous microscope.....	88
IV. 1. 2. 1. Normalisation des déclins.....	88
IV. 1. 2. 2. Validation de la mesure d'anisotropie.....	92
IV. 1. 2. 3. Variation de r_0 en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif.....	94
IV. 2. Caractérisation des sondes fluorescentes utilisées en cellules vivantes.....	95
IV. 2. 1. La GFP.....	95
IV. 2. 1. 1. Déclins de fluorescence de la GFP et variants spectraux.....	96
IV. 2. 1. 1. 1. La GFP.....	97
IV. 2. 1. 1. 2. La CFP.....	98
IV. 2. 1. 1. 3. La YFP.....	100
IV. 2. 1. 1. 4. La BFP.....	102
IV. 2. 1. 1. 5. La DsRed.....	104
IV. 2. 1. 2. Déclins de fluorescence de la GFP fusionnée à différentes protéines d'intérêt.....	107
IV. 2. 1. 2. 1. Durées de vie de la GFP en fonction du temps après transfection.....	107
IV. 2. 1. 2. 2. Durées de vie des protéines fusion GFP.....	108
IV. 2. 1. 2. 3. Discussion.....	110
IV. 2. 1. 3. Couples de FRET et R_0	111
IV. 2. 1. 3. 1. Couple BFP / GFP.....	111
IV. 2. 1. 3. 2. Couple CFP / YFP.....	112
IV. 2. 1. 3. 3. Couple GFP / DsRed.....	112
IV. 2. 1. 3. 4. HomoFRET GFP.....	114
IV. 2. 1. 4. Déclins d'anisotropie de la GFP seule en solution et en cellule..	114
IV. 2. 2. L'éthidium.....	117
IV. 2. 2. 1. Durées de vie de l'éthidium.....	118
IV. 2. 2. 2. Un exemple in-vitro : interaction éthidium-ARNt ^{phe}	119
IV. 2. 2. 3. Intercalation de l'éthidium dans l'ADN nucléaire de cellules vivantes.....	124

IV. 2. 2. 3. 1. Evidence de l'intercalation de l'éthidium dans l'ADN nucléaire.....	126
IV. 2. 2. 3. 2. Mesure des concentrations intracellulaires de l'éthidium libre et intercalé.....	129
IV. 2. 2. 3. 3. Perturbations du marquage nucléaire de l'éthidium par perméabilisation.....	131
Chapitre V : Résultats biologiques.....	134
V. 1. Interactions de protéines hétérologues.....	134
V. 1. 1. Le facteur de transcription NF-E2.....	134
V. 1. 2. Résultats.....	136
V. 1. 2. 1. Interaction p45 – MafG dans le noyau.....	136
V. 1. 2. 2. Interaction de p45 avec un partenaire cytoplasmique.....	140
V. 1. 3. Discussion.....	144
V. 1. 3. 1. Validité des mesures de FRET en utilisant la DsRed.....	145
V. 1. 3. 2. Proportion de protéines en interaction et distances mesurées.....	146
V. 1. 3. 3. Interprétation biologique.....	147
V. 2. Interaction de protéines homologues.....	148
V. 2. 1. La Thymidine Kinase du virus de l'herpès simplex type I.....	148
V. 2. 2. Résultats.....	151
V. 2. 2. 1. Interactions mesurées par hétéroFRET.....	151
V. 2. 2. 2. Interactions mesurées par homoFRET.....	157
V. 2. 2. 2. 1. Diffusion rotationnelle des protéines fusion GFP.....	157
V. 2. 2. 2. 2. HomoFRET et interactions homologues.....	160
V. 2. 2. 2. 3. Modélisation de l'HomoFRET pour un dimère TK-GFP.....	162
V. 2. 3. Discussion.....	165
V. 2. 3. 1. Comparaison hétéroFRET-homoFRET pour la caractérisation d'interactions homologues.....	165
V. 2. 3. 2. Interprétation biologique : relation structure – activité en cellules vivantes.....	168
V. 3. Dynamique locale de macromolécules.....	170
V. 3. 1. Dynamique torsionnelle de l'ADN.....	170
V. 3. 2. Résultats.....	172
V. 3. 2. 1. Déclins d'anisotropie de l'éthidium dans le noyau de cellules vivantes.....	172

V. 3. 2. 2. Dynamique torsionnelle restreinte de l'ADN nucléaire en cellules vivantes.....	174
V. 3. 2. 3. Effet de l'augmentation de la concentration d'éthidium sur la dynamique torsionnelle de l'ADN nucléaire.....	178
V. 3. 3. Discussion	180
V. 3. 3. 1. L'anisotropie de l'éthidium comme outil non-invasif de l'étude de la dynamique locale de l'ADN en cellules vivantes.....	181
V. 3. 3. 2. Interactions ADN – protéine qui restreignent la dynamique torsionnelle de l'ADN nucléaire en cellules vivantes.....	183
V. 3. 3. 3. Perspectives.....	185
Chapitre VI : Conclusion et potentialités de la technique	187
Chapitre VII : Matériels et méthodes	192
VII. 1. Chimie et biologie	192
VII. 1. 1. Solutions fluorescentes pour les expériences in vitro	192
VII. 1. 1. 1. Solution de rhodamine.....	192
VII. 1. 1. 2. Solution de GFP.....	192
VII. 1. 1. 3. Solution ADN – bromure d'éthidium.....	192
VII. 1. 1. 4. Solution ARN ^{t^{phe}} – bromure d'éthidium.....	192
VII. 1. 2. Plasmides recombinants	193
VII. 1. 2. 1. Plasmides XFP et DsRed.....	193
VII. 1. 2. 2. Plasmides recombinants p45, MafG et PC.....	193
VII. 1. 2. 3. Plasmides recombinants TK.....	193
VII. 1. 3. Cellules	194
VII. 1. 3. 1. Cultures cellulaires.....	194
VII. 1. 3. 2. Transfections.....	195
VII. 1. 3. 3. Marquage avec l'éthidium.....	195
VII. 2. Microscopie	196
VII. 2. 1. Microscopie de fluorescence stationnaire	196
VII. 2. 1. 1. Microscope.....	196
VII. 2. 1. 2. Quantification et traitement de l'image.....	196
VII. 2. 2. Microscopie de déclins de fluorescence	197
VII. 2. 2. 1. Montage confocal.....	197
VII. 2. 2. 2. Montage DL.....	197
VII. 2. 2. 3. Analyse des données.....	197

Références	198
-------------------------	-----

Annexes	209
----------------------	-----

Table des illustrations

Article n°1 : Tramier M., Kemnitz K., Durieux C., Coppey J., Denjean P., Pansu R. B. and Coppey-Moisan M. "Restrained torsional dynamics of nuclear DNA in living proliferative mammalian cells". *Biophys. J.*, **78** : 2614-2627, 2000.

Article n°2 : Tramier M., Gautier I., Durieux C., Coppey J., Pansu R. B., Nicolas J.-C., Kemnitz K. and Coppey-Moisan M. "Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins". *Biophys. J.*, **80** : sous presse, 2001

Une collaboration durant cette thèse a fait l'objet d'une publication :
Piolot T., Tramier M., Coppey M., Nicolas J.-C. and Marechal V. "Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes". *J. Virol.*, **75** : 3948-3959, 2001.

Résumé

Le but de notre travail est de développer une imagerie des déclins de fluorescence et d'en démontrer les potentialités pour l'étude de la dynamique macromoléculaire et des interactions entre macromolécules en cellules vivantes. Notre approche repose sur la mesure de la corrélation temporelle de photons uniques de fluorescence (TCSPC) simultanément à la détermination de la localisation spatiale (le long d'une ligne) de la région d'émission. Des images monodirectionnelles de déclins de fluorescence ont ainsi été obtenues représentant la cinétique de fluorescence en différentes régions subcellulaires. Nous avons également mis au point la mesure de déclins d'anisotropie de fluorescence provenant d'un petit volume subcellulaire ($1 \mu\text{m}^3$) sous microscope en mode confocal.

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent l'intérêt de cette approche technologique pour des problématiques de biologie cellulaire. Le marquage fluorescent endogène de protéines a été réalisé en les fusionnant à la GFP ou un de ses variants spectraux. Les interactions protéine-protéine ont été étudiées soit par hétéroFRET en mesurant la diminution de la durée de vie de fluorescence du chromophore donneur, soit par homoFRET en mesurant la cinétique de dépolarisation de la fluorescence. Nous avons mis en évidence (i) la formation d'hétérodimères de p45 du facteur de transcription NF-E2 avec deux partenaires dans différents compartiments subcellulaires par hétéroFRET, et (ii) l'homodimérisation de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex type 1 de façon plus concluante par homoFRET que par hétéroFRET. Par ailleurs, la mesure des déclins d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium comme sonde de la dynamique torsionnelle de l'ADN a révélé l'existence d'une très forte restriction de cette dynamique dans la chromatine non perturbée. Les développements supplémentaires de notre système pour une imagerie bi-dimensionnelle puis tri-dimensionnelle sont prometteurs.

Abstract

The aim of our work was to develop fluorescence decay imaging and to demonstrate its utility in the study of macromolecular dynamics and the interactions between macromolecules in live cells. Our approach consisted of simultaneous time-correlated single photon counting (TCSPC) and characterisation of spatial localisation of emission area along a line. Monodirectional fluorescence decay imaging was obtained that was characteristic of fluorescence kinetics in different subcellular regions. Fluorescence anisotropy decays from a small subcellular volume ($1 \mu\text{m}^3$) were also measured under a microscope in confocal mode.

The results show that this technological approach is useful for investigating the biology of living cells. Endogenous fluorescent labelling of proteins was carried out by GFP or spectral mutants fusion. Protein-protein interactions were studied by measuring donor fluorescence lifetime diminution (heteroFRET) or fluorescence depolarisation kinetics (homoFRET). We demonstrated the formation of (i) heterodimers of the p45 protein of NF-E2 transcription factor with two partners in different subcellular compartments by heteroFRET, and (ii) herpes simplex type 1 thymidine kinase dimer. In the latter case, homoFRET was more efficient at demonstrating dimerisation than heteroFRET. Moreover, measurement of ethidium fluorescence anisotropy decay demonstrated that DNA torsional dynamics, are restricted inside non-perturbed chromatin. Further developments in bi-dimensional and tri-dimensional imaging are promising.

Abréviations

ADN : acide désoxiribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messagé

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ARNt^{phe} : acide ribonucléique de transfert
phénylalanine

BFP : blue fluorescent protein

CCD : Charge Coupled Device

CFP : cyan fluorescent protein

DL : détecteur Delay-Line

DMEM : milieu de Eagle modifié par Dubelco

DsRed : *Discocoma* red fluorescent protein

FCS : spectroscopie de corrélation de
fluorescence

FLIM : microscopie des durées de vie de
fluorescence en mode image

FRAP : réapparition de fluorescence après
photoblanchiment

FRET : transfert de fluorescence de type
Förster

FWHM : largeur à mi-hauteur

GFP : green fluorescent protein

GFPwt : GFP wild type, sauvage

hétéroFRET : FRET entre chromophores
différents

homoFRET : FRET entre chromophores
identiques

HBSS : solution saline équilibrée de Hanks

HSV : virus de l'herpès *simplex*

IRF : fonction de réponse instrumentale

MafG : petite protéine G de la famille des Maf

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
réduit

NF-E2 : facteur nucléaire Erythroïde 2

ON : Ouverture Numérique

p45 : protéine de poids moléculaire 45 kDa de
NF-E2

PC : protéine partenaire cytoplasmique de p45

pX : plasmide codant pour la protéine X

QA : détecteur Quadrant-Anode

R₀ : distance de Förster

r₀ : anisotropie initiale

Rd6G : rhodamine 6G

SD : déviation standard

SHG : génération de second harmonique

SLN : signal de localisation nucléaire

TAC : convertisseur temps-amplitude

TCSPC : comptage de photons uniques
corrélés en temps

Ti:Sa : Titane:Saphir

TK : protéine thymidine kinase

TSCSPC : comptage de photons uniques
corrélés en temps et en espace

XFP : GFP et variants spectraux

YFP : yellow fluorescent protein

Chapitre I : Introduction générale

L'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le fonctionnement du vivant est un domaine où de multiples approches expérimentales ne cessent de se développer. En particulier, des études sont menées pour comprendre et analyser le rôle de structures macromoléculaires impliquées dans différents mécanismes cellulaires et leur régulation.

De nombreuses méthodes ont pour objectif la caractérisation de la dynamique macromoléculaire et des interactions entre macromolécules. Différentes techniques servant à mesurer les interactions protéine-protéine sont présentées de manière détaillée et exhaustive par Phizicky et Fields (Phizicky & Fields, 1995). Il se dégage de cette revue une classification entre (i) les méthodes de biologie cellulaire classique utilisant des extraits cellulaires (chromatographie d'affinité, co-immunoprécipitation, réticulation...), (ii) les méthodes d'estimation et de détermination de constantes d'affinité à partir de protéines purifiées, et (iii) les méthodes génétiques ou utilisant des bibliothèques de gènes afin de cribler les différents partenaires potentiels d'une protéine. Cependant, les techniques de fluorescence n'y sont pas abordées.

Les méthodes utilisant la fluorescence s'avèrent être des outils tout à fait adaptés à la cellule vivante. Elles permettent, de plus, un suivi spatio-temporel des interactions entre macromolécules et de la dynamique macromoléculaire.

I. 1. Méthodes de fluorescence pour caractériser les complexes macromoléculaires

La luminescence est le phénomène d'émission de photons à partir d'une molécule dans un état électronique excité. En retournant à son état fondamental à partir de l'état excité, l'énergie perdue par la molécule se transforme en un photon, le phénomène est dit radiatif. On peut distinguer différents types de luminescence suivant la nature de l'état excité. Lorsque la molécule excitée est dans un état singulet, l'émission de photons est appelée fluorescence. Les propriétés cinétiques de la fluorescence varient en fonction du microenvironnement du chromophore. C'est donc un moyen d'évaluer les paramètres physiques et structuraux locaux liés au milieu et/ou à la sonde fluorescente. Il est possible de mesurer des paramètres tel que la polarité, la microviscosité, la mobilité

moléculaire, des distances à l'échelle supramoléculaire (pour revue, voir (Valeur, 1993)). Quatre méthodes principales sont plus particulièrement utilisées pour étudier la dynamique macromoléculaire et les interactions entre macromolécules.

1. 1. 1. Le FRET

Le principe de transfert d'énergie de fluorescence de type Förster (FRET pour Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Förster, 1948) est détaillé chapitre II. 2. Brièvement, lorsque deux fluorophores, un donneur et un accepteur dont les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur se recouvrent, se trouvent à une distance inférieure à 100 Å et que leurs dipôles de transition électronique ont une orientation respective appropriée, il existe un transfert d'énergie de fluorescence. Les méthodes consistant à mesurer ce transfert sont parfaitement adaptées à l'étude des interactions macromoléculaires. Elles permettent de mesurer des distances intra ou intermoléculaires de quelques nanomètres. Le FRET est considéré comme une règle spectroscopique pour caractériser la structure de complexes macromoléculaires (Stryer, 1978).

1. 1. 2. L'anisotropie de fluorescence

Le principe des déclins d'anisotropie et leur modélisation est présenté en détail chapitre II. 3. Brièvement, après excitation d'un échantillon par une lumière polarisée, l'émission de fluorescence possède des propriétés de polarisation. A l'état excité, tout phénomène susceptible de faire varier l'orientation du dipôle d'émission du fluorophore aura un effet sur ces propriétés. Le travail de Gregorio Weber sur l'anisotropie de fluorescence comme outil pour l'étude de protéines et macromolécules a été déterminant (Weber, 1953, Weber, 1954).

Les principaux événements influant sur l'anisotropie sont les mouvements rotationnels du chromophore. Pour une macromolécule marquée, tous les mouvements, locaux ou globaux, sont susceptibles de modifier l'orientation du dipôle d'émission. L'anisotropie est alors directement reliée à la dynamique des macromolécules. Il est par exemple possible d'étudier des interactions

protéine-protéine par polarisation de fluorescence en étudiant la vitesse de diffusion rotationnelle d'une protéine liée ou non à son partenaire (Jameson & Seifried, 1999).

Le transfert d'énergie de fluorescence est aussi susceptible d'influer sur l'anisotropie. Le FRET peut avoir lieu entre deux chromophores identiques (homoFRET). Dans ce cas, la durée de vie et les propriétés spectrales de la fluorescence ne varient pas, seule la dépolérisation de la fluorescence permet de caractériser le phénomène (Weber, 1954). L'homoFRET par anisotropie a récemment été utilisé *in vitro* pour étudier la structure (Bastiaens et al., 1992) et l'oligomérisation de protéines (Blackman et al., 1998, Runnels & Scarlata, 1995). De plus, la cinétique des déclin d'anisotropie permet de déterminer la vitesse de transfert et de calculer, sous certaines conditions, la distance moyenne entre les chromophores (Bastiaens et al., 1992, Bergström et al., 1999) et la détermination structurale de complexes protéine-ligand en solution (Wylczynska et al., 1997).

I. 1. 3. Le FRAP

La réapparition de fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour Fluorescence Recovery After Photobleaching) permet de mesurer la diffusion translationnelle des molécules (Axelrod et al., 1976) (Fig. I. 1).

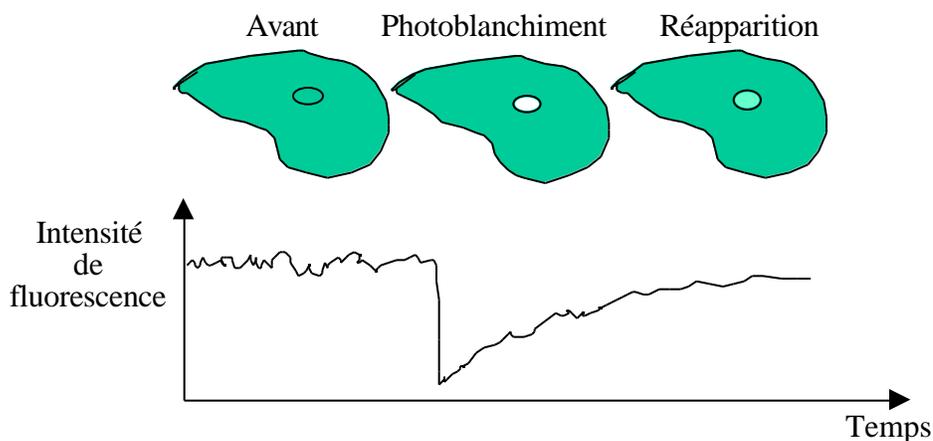


Figure I. 1 : Le FRAP.

La méthode consiste à suivre la cinétique de réapparition de l'intensité de fluorescence provenant d'un volume dont les fluorophores ont été détruits par photoblanchiment.

En FRAP, les molécules fluorescentes présentes dans le volume d'observation sont détruites en utilisant la pleine puissance d'un laser. On mesure alors la réapparition de la fluorescence dans ce volume qui provient de la diffusion des molécules fluorescentes voisines qui n'ont pas été détruites.

I. 1. 4. La FCS

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS pour Fluorescence Correlation Spectroscopy) a été formalisée en 1974 par Elson et Magde (Elson & Magde, 1974). Rigler a utilisé et développé ce formalisme pour proposer une méthode expérimentale de FCS (Rigler et al., 1993). En 1997, un montage commercial est mis sur le marché par Zeiss : le Confocor. Le principe de la FCS consiste à observer l'amplitude et la fréquence des fluctuations de l'intensité de fluorescence dans un volume (Fig. I. 2).

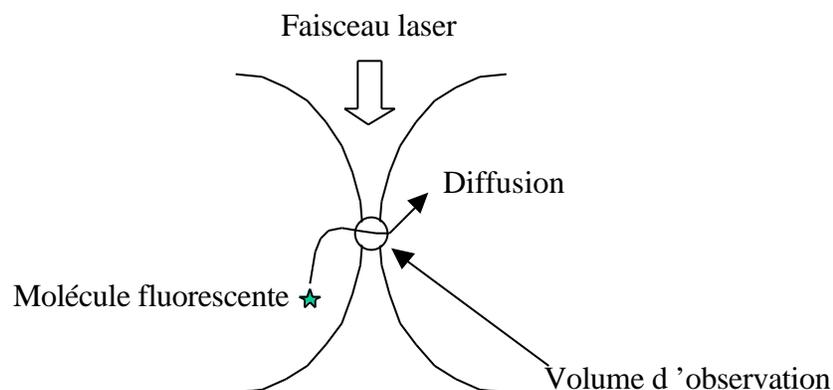


Figure I. 2 : La FCS.

Le principe consiste à mesurer les fluctuations de fluorescence dans un volume confocal. Ces fluctuations sont principalement dépendantes de la diffusion de molécules fluorescentes entrant et sortant du volume d'observation.

Ces fluctuations sont corrélées avec les mouvements browniens de diffusion des particules entrant dans le volume d'observation et en sortant, mais aussi de tout processus réactif à l'échelle moléculaire qui jouerait sur l'intensité de fluorescence. Des développements récents de cette technique permettent de mesurer les fluctuations de fluorescence pour deux couleurs (Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy) (Schwille et al., 1997). Il est alors envisageable de mesurer non seulement la diffusion de chaque couleur mais aussi les éventuelles interactions entre les deux espèces moléculaires marquées par chaque couleur. On peut aussi imaginer d'effectuer des

mesures de FCS en polarisation en utilisant une source excitatrice polarisée et en recueillant les fluctuations à travers un polariseur. La fenêtre de temps accessible permettrait de mesurer des vitesses de diffusion rotationnelle très lentes impossibles à mesurer par déclin d'anisotropie.

I. 2. Marquage endogène de protéines : la GFP

La *green fluorescent protein* (GFP) de la méduse *Aequorea victoria* possède des propriétés de fluorescence remarquables (pour revue voir (Tsien, 1998)) qui en font un marqueur d'expression idéal en cellule vivante (Chalfie et al., 1994). La séquence de l'ADN codant pour la protéine a été modifiée pour obtenir une séquence plus proche de celle des protéines de mammifères (Zolotukhin et al., 1996).

Son chromophore se forme spontanément, dans les cellules et les organismes, par cyclisation et oxydation de trois acides aminés Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶ et Gly⁶⁷ (Cody et al., 1993, Cubitt et al., 1995). Sous forme sauvage, le spectre d'absorption de la GFP (GFPwt) est constitué de deux bandes, l'une à 390 nm, l'autre à 480 nm (Fig. I. 3. A). Ces deux bandes d'absorption correspondent à la forme protonée et déprotonée du chromophore, respectivement (Tsien, 1998). Une transition rapide, à l'état excité, de la forme protonée vers la forme déprotonée résulte en une unique bande d'émission à 505 nm (Fig. I. 3. A).

En mutant certains acides aminés de la GFPwt, il a été obtenu différentes protéines fluorescentes ayant des propriétés d'absorption et d'émission différentes (Heim & Tsien, 1996, Miyawaki et al., 1997) (pour revue, (Tsien, 1998)). Ces mutations se présentent suivant deux groupes :

(i) les mutations des acides aminés participant directement au chromophore ou étant impliqués dans l'environnement électronique du chromophore. La mutation S65T stabilise le chromophore sous forme déprotonée absorbant à 480 nm. La bande d'absorption à 390 nm a ainsi disparu (Fig. I. 3. B). Associée à cette première mutation, la mutation Y66H change radicalement la nature chimique du chromophore et induit un déplacement de la fluorescence du vert vers le bleu. En effet, ce mutant (BFP) présente un maximum d'absorption à 380 nm et un maximum d'émission à 440 nm (Fig. I.

3. C). Toujours combinées à la première mutation S65T, les mutations Y66W (participant directement au chromophore) et N146I (impliqué dans l'environnement électronique du chromophore) induisent la formation d'un chromophore présentant deux bandes d'absorption qui se recouvrent, de maximum 433 nm et 453 nm, et deux bandes d'émission qui se recouvrent aussi, de maximum 475 nm et 501 nm (Fig. I. 3. D, mutant CFP). La mutation T203Y, qui perturbe l'environnement électronique du chromophore, associée à la mutation S65G ou S65T induit la formation d'un chromophore dont les spectres d'absorption et d'émission sont déplacés dans le rouge par rapport au mutant S65T (de 480 à 514 nm et de 505 à 527 nm) (Fig. I. 3. E, mutant YFP).

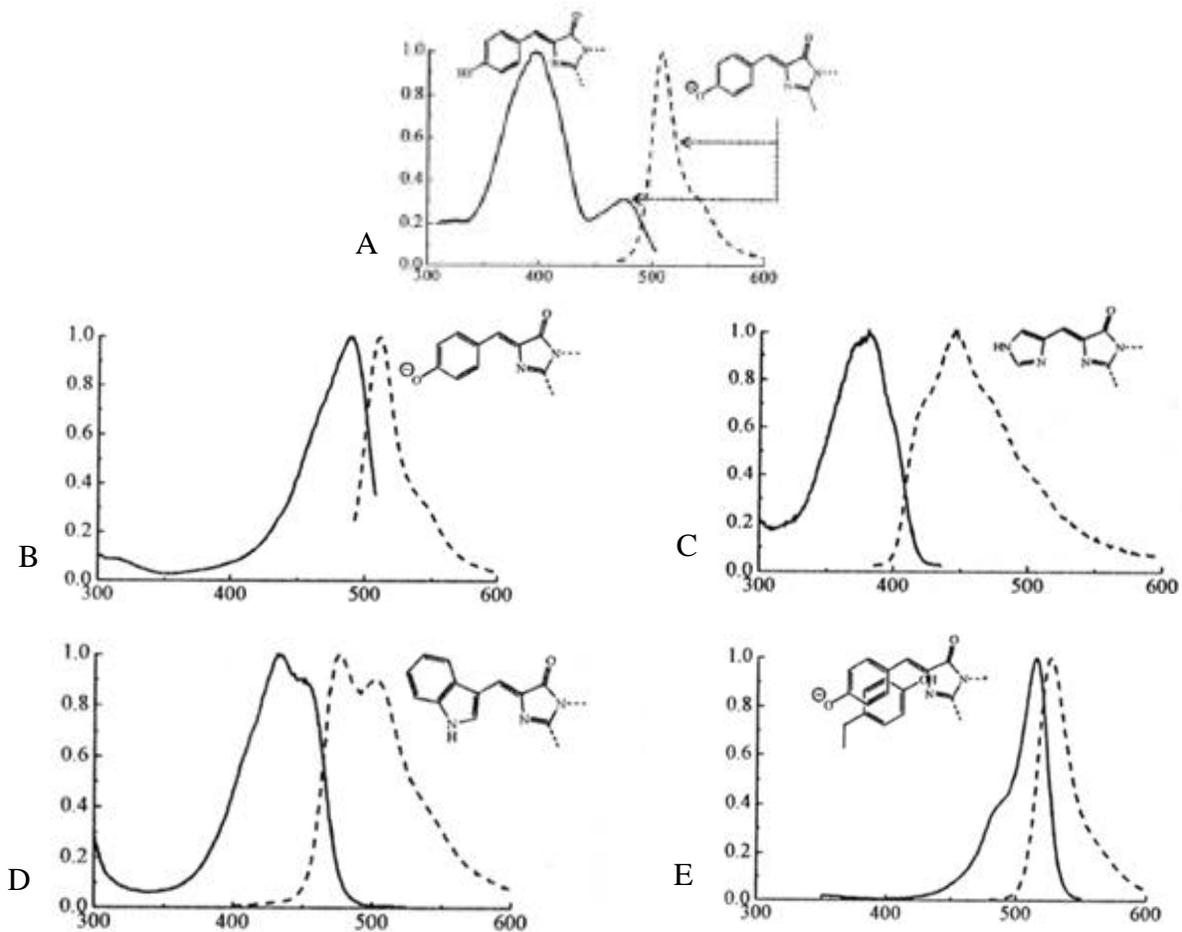


Figure I. 3 : Spectres de fluorescence des différents variants spectraux de la GFP.

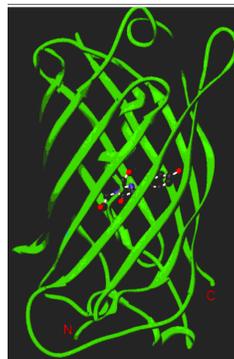
Sont présentés les spectres d'absorption (continu) et d'émission (pointillé) et les chromophores associés aux différents mutants (voir texte). A : GFPwt ; B : GFP(S65T) ; C : BFP ; D : CFP ; E : YFP. D'après Tsien, *Annu Rev Biochem*, 1998.

(ii) les mutations qui aident et stabilisent le repliement de la protéine (F64L, V68L, S72A, Y145F, M153T, V163A). A titre d'exemple, la mutation F64L qui, associée à la mutation S65T, donne naissance à une protéine fluorescente présentant une meilleure photostabilité et un rendement quantique plus élevé (Heim et al., 1995).

De nombreuses propriétés photophysiques et photochimiques de ces protéines fluorescentes semblent encore largement incomprises. Une étude récente présente la possibilité de photoconversion du chromophore (Creemers et al., 2000) compliquant sensiblement les hypothèses pouvant expliquer les différentes propriétés de fluorescence associées à cette famille de protéine.

De tous les divers mutants de la GFPwt, aucun n'a présenté jusqu'alors de propriétés spectrales de fluorescence significativement déplacées dans le rouge. Aussi, une nouvelle protéine fluorescente, la DsRed, a-t-elle été récemment clonée à partir du corail *Discocoma* (Fradkov et al., 2000, Matz et al., 1999). Cette protéine possède des propriétés d'émission de fluorescence dans le rouge (maximum à 580 nm).

La structure tertiaire de la GFP a été résolue par cristallographie (Ormo et al., 1996). Elle consiste en un tonneau cylindrique de 24 Å de diamètre et 42 Å de long constitué de 11 feuillets entourant une hélice (Fig. I. 4).



D'après Ormö et al. Science 1996

Figure I. 5 : Représentation de la structure tertiaire de la GFP.

La GFP a une structure tertiaire (en vert) en forme de tonneau. Les extrémités C- et N-terminales sont notées en rouge. La structure du chromophore est matérialisée par les acides aminés qui se cyclisent à l'intérieur de la protéine.

Le chromophore de la GFP est porté par l'hélice centrale. Les propriétés de fluorescence de la GFP sont très sensibles au repliement (Chattoraj et al., 1996) ou à des modifications de structure tertiaire (Volkmer et al., 2000). La topologie de la structure cristalline de la DsRed est similaire à celle de la GFP (Wall et al., 2000). Dans ce cas aussi, le chromophore est porté par l'hélice centrale (Gross et al., 2000).

La stratégie pour marquer les protéines avec les GFP et variants consiste à les fusionner par génie génétique à la GFP ou à l'un de ces variants spectraux puis à les exprimer transitoirement par transfection. Il a récemment été montré que le repliement du domaine GFP fusionné en C-terminal à une protéine est directement relié au bon repliement de la partie N-terminale de cette protéine fusion (Waldo et al., 1999). Le chromophore seul ainsi que la protéine dénaturée ne fluorescent pas (Tsien, 1998). La fluorescence de la GFP constituerait donc un contrôle du repliement de la protéine d'intérêt qui lui est fusionnée. Même s'il s'agit de rester prudent concernant les perturbations éventuelles sur l'activité des protéines après fusion à la GFP, cette approche, de plus en plus répandue en biologie cellulaire, permet non seulement de localiser en cellule vivante des protéines mais aussi, comme nous allons le voir, de mesurer à l'échelle moléculaire la dynamique et les interactions de ces protéines.

I. 3. Fluorescence et cellule vivante

Compte tenu des propriétés non invasives de la fluorescence, toutes les méthodes l'utilisant présentent un avantage certain. La fluorescence peut se mesurer facilement dans différents contextes expérimentaux, que ce soit en solution ou en cellule vivante. Avec le développement du marquage endogène spécifique de macromolécules par des sondes fluorescentes, dont le meilleur exemple est la GFP, l'enjeu est de développer les méthodes de fluorescence présentées précédemment pour l'étude de la dynamique et des interactions de macromolécules en cellules vivantes.

L'utilisation de la FCS en cellules vivantes n'a pas encore connu un développement très important. Plus le nombre moyen de fluorophores dans le volume d'observation est faible et plus la détection de fluctuations d'intensité est facile. La difficulté de distinguer les molécules d'intérêt

fluorescentes en faible quantité des molécules autofluorescentes endogènes rend l'utilisation de cette technique délicate. Néanmoins, quelques travaux rendent compte de l'application de la FCS pour sonder la diffusion intra-cellulaire de molécules fluorescentes (Berland et al., 1995, Gennerich & Schild, 2000, Goedhart et al., 2000) démontrant la faisabilité de cette approche et présageant dans les années à venir un développement conséquent de cette méthode en biologie cellulaire.

Le FRAP permet de caractériser la diffusion translationnelle de molécules marquées. Au départ, le FRAP en cellule vivante consistait principalement à mesurer la mobilité latérale de molécules membranaires (Jacobson et al., 1976). Verkman et son équipe ont utilisé cette méthode avec la GFP pour caractériser la microviscosité dans le cytoplasme (Swaminathan et al., 1997), dans le reticulum endoplasmique (Dayel et al., 1999) et dans la matrice mitochondriale (Partikian et al., 1998). Avec le développement commercial des microscopes confocaux permettant de faire du FRAP, de très nombreuses études de biologie cellulaire utilisent aujourd'hui cette approche (pour revue, voir (White & Stelzer, 1999)).

De nombreuses études, effectuées d'abord sur des vésicules lipidiques en solution, puis en cellule vivante, ont utilisé l'anisotropie stationnaire pour caractériser les membranes. La détermination de l'orientation de chromophores dans la bicouche lipidique donne des informations sur l'organisation de cette bicouche. Plus récemment, l'homoFRET mesuré par anisotropie de fluorescence a permis de caractériser l'organisation de protéines membranaires en micro-domaines à la surface de la cellule (Varma & Mayor, 1998). L'anisotropie est un outil de choix pour caractériser plus finement les *lipid rafts* (Jacobson, 1999). L'étude des déclin d'anisotropie a également permis à l'équipe de Verkman d'étudier la diffusion rotationnelle de la GFP exprimée en cellule vivante parallèlement aux études de FRAP dans le cytoplasme (Swaminathan et al., 1997), dans le réticulum endoplasmique (Dayel et al., 1999) et dans la matrice mitochondriale (Partikian et al., 1998).

Le FRET est aujourd'hui une approche très utilisée en cellules vivantes. Différents couples de protéines mutantes GFP sont susceptibles d'être utilisés pour des expériences de transfert d'énergie (Heim, 1999). On peut distinguer deux types d'applications utilisant cette méthode :

(i) soit l'étude des interactions protéine-protéine en construisant des protéines fusionnées aux GFP et variants spectraux (Li et al., 2001, Llopis et al., 2000, Mahajan et al., 1998, Sorkin et al., 2000, Xia et al., 2001) ou en microinjectant des protéines préalablement marquées (Wouters et al., 1998) ;

(ii) soit la mesure des propriétés biologiques telles que l'activité calcium intra-cellulaire (Miyawaki et al., 1997), l'activation de la caspase 3 impliquée dans l'apoptose (Harpur et al., 2001, Tyas et al., 2000, Xu et al., 1998), l'activation de la protéine kinase C (Ng et al., 1999a, Ng et al., 1999b), l'activité de phosphorylation de la protéine kinase A (Nagai et al., 2000), la phosphorylation du récepteur de facteur de croissance épidermal (Verveer et al., 2000, Wouters & Bastiaens, 1999), l'activité phospholipase C (van Der Wal et al., 2001) ou la dynamique spatio-temporelle de la GMP cyclique (Honda et al., 2001). Dans toutes ces applications, le principe consiste à détecter la variation de FRET soit sur une même protéine doublement marquée après clivage ou transconformation, soit entre une protéine simplement marquée et un anticorps marqué reconnaissant un site particulier.

Une approche similaire, appelée *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* (BRET) s'est développée récemment (Xu et al., 1999). Contrairement au FRET, le donneur n'est pas un fluorophore mais une molécule bioluminescente, comme par exemple la luciférase transférant son énergie à la GFP. Il n'est pas nécessaire d'exciter le système par une source lumineuse, ce qui est un avantage. Mais le principal inconvénient réside dans la faible intensité de la bioluminescence pour effectuer des mesures en imagerie cellulaire.

Ainsi, les outils nécessaires à ces études en cellule vivante font aujourd'hui l'objet d'intenses efforts de développement. Pour obtenir une meilleure sensibilité au FRET ou pour obtenir des déclins d'anisotropie en cellules vivantes, une imagerie des durées de vie de fluorescence sous microscope (FLIM pour Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) a vu le jour en phase et modulation (Bastiaens & Squire, 1999, Lakowicz et al., 1992, So et al., 1995, Squire et al., 2000, Verkman et al., 1991), et avec des caméras CCD (Charge Coupled Device) à obturateur très rapide (Dowling et al., 1998, Straub & Hell, 1998). Une imagerie de déclins de fluorescence par comptage

de photons uniques corrélés en temps (TCSPC pour Time Correlated Single Photon Counting) se développe également (Jakobs et al., 2000, Kemnitz et al., 1997). Le point crucial consiste à démontrer leur potentialité pour suivre les interactions dans le temps de la physiologie cellulaire. Leur utilisation dans tous les champs thématiques de la biologie cellulaire ouvre des perspectives nouvelles aux études post-génomiques et présente un éclairage nouveau pour la compréhension des mécanismes du vivant.

Mon travail de thèse porte sur le développement d'un système d'imagerie utilisant la méthode de TCSPC. A l'aide des techniques de biologie moléculaire permettant l'expression de protéines fusionnées à la GFP (et ses variants spectraux) en cellules et des méthodes utilisant les déclins de fluorescence pour mesurer le FRET et les déclins d'anisotropie, nous avons pu mettre en évidence, dans le cadre de différentes problématiques biologiques, (i) des interactions entre deux protéines par FRET, (ii) la dimérisation d'une protéine par FRET et anisotropie (dépolariation de la fluorescence par homoFRET), et (iii) les mouvements de dynamique torsionnelle de l'ADN nucléaire par anisotropie d'un intercalant fluorescent. Au vu de ces résultats, cette approche s'avère très prometteuse pour la caractérisation à l'échelle moléculaire de la dynamique et des interactions de macromolécules en cellules vivantes.

Chapitre II : Théorie et modèles

L'objet de cette étude est d'utiliser comme outil expérimental la fluorescence dans un contexte de problématiques biologiques. Aux questions essentielles de l'étude de la dynamique et des interactions macromoléculaires en cellule vivante, la fluorescence, par ses propriétés transitoires et non-invasives, permet d'apporter un certain nombre de réponses. Pour ce faire, la compréhension analytique des phénomènes physiques et chimiques mis en jeu dans l'expérience est un prérequis essentiel à l'exploitation des résultats. Si l'on appréhende la complexité des phénomènes photophysiques au niveau moléculaire, les informations expérimentales deviennent exploitables au niveau biologique. Il est présenté dans ce chapitre théorique les aspects cinétiques de la fluorescence (Lakowicz, 1983) ainsi que les modèles concernant le transfert d'énergie de type Förster et ceux concernant la dépolarisation de la fluorescence ultérieurement utilisés pour exploiter les résultats expérimentaux.

II. 1. Fluorescence et durée de vie

II. 1. 1. Diagramme de Perrin-Jablonski

Les molécules présentant des propriétés de fluorescence possèdent au moins un électron délocalisé. Lorsque la molécule absorbe un photon, elle change de niveau d'énergie électronique passant de l'état fondamental à un état énergétique supérieur. Le phénomène de fluorescence se caractérise par l'émission d'un photon lorsque la molécule revient à son état fondamental. Il est dit radiatif. Perrin a été le premier à caractériser les relations entre niveau d'énergie et fluorescence (voir (Nickel, 1996)). Ultérieurement, Jablonski a proposé une représentation des différents niveaux d'énergie et des sauts entre ces niveaux associés au phénomène de fluorescence (Jablonski, 1935). Le diagramme de Perrin-Jablonski est présenté en figure II. 1. Les différents sauts sont quantiques, mais entre chaque état singulet, S_0 , S_1 et S_2 , il existe différents niveaux vibrationnels et rotationnels. L'absorption s'effectue du niveau fondamental vers les différents niveaux vibrationnels de chaque état singulet. Après relaxation vibrationnelle et/ou conversion interne, phénomènes très rapides, de l'ordre de 10^{11} à 10^{14} s⁻¹, lorsque la désexcitation s'arrête au plus faible niveau vibrationnel

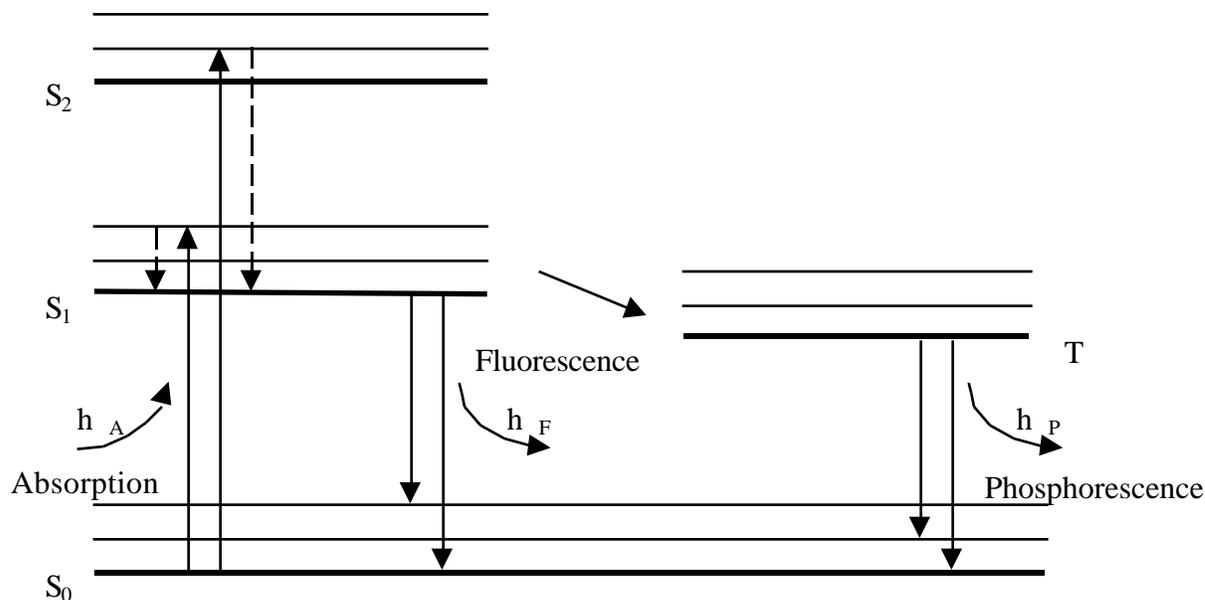


Figure II. 1 : Diagramme de Perrin-Jablonski.

Les niveaux S₀, S₁ et S₂ correspondent aux états singulets de la molécule, le niveau T₁ est l'état triplet.

de l'état S₁, il y a alors la possibilité d'une activité photoinduite telle que la fluorescence ou la phosphorescence. La fluorescence correspond au saut énergétique entre le niveau S₁ et les différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental simultanément à l'émission d'un photon. La phosphorescence provient du passage de l'état singulet S₁ vers l'état triplet T₁. Cet état étant plus stable, le phénomène de désexcitation par émission d'un photon est plus lent.

II. 1. 2. Spectre d'absorption, d'émission et déplacement de Stokes

A chaque saut quantique, faisant passer la molécule de son état fondamental S₀ aux différents niveaux vibrationnels des états singulet S₁ et S₂, correspond une longueur d'onde de la lumière d'excitation. L'efficacité d'absorption des photons dépend de leur énergie. Ainsi, le coefficient d'extinction molaire, ϵ , varie en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Il en résulte la notion de spectre d'absorption qui rend compte de la variation spectrale de l'efficacité d'absorption.

Deux mesures spectroscopiques permettent d'accéder à cette variation:

(i) - la mesure de l'absorbance qui obéit à la loi de Beer-Lambert,

$$\text{Log } I_0(\lambda) / I(\lambda) = (\epsilon) C l \quad (\text{II. 1. 1})$$

où I_0 est l'intensité de la lumière incidente, I l'intensité de la lumière transmise, C la concentration de l'espèce absorbante et l le chemin optique de la lumière.

(ii) - la mesure du spectre d'excitation pour les espèces fluorescentes en mesurant les variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation, sachant que pour une population homogène de molécules fluorescentes (fluorophores), l'intensité de fluorescence dépend du nombre de molécules excitées. Le spectre d'excitation et le spectre d'absorption sont généralement superposables. Le spectre d'excitation de la GFP (S65T) est présenté figure II. 2.

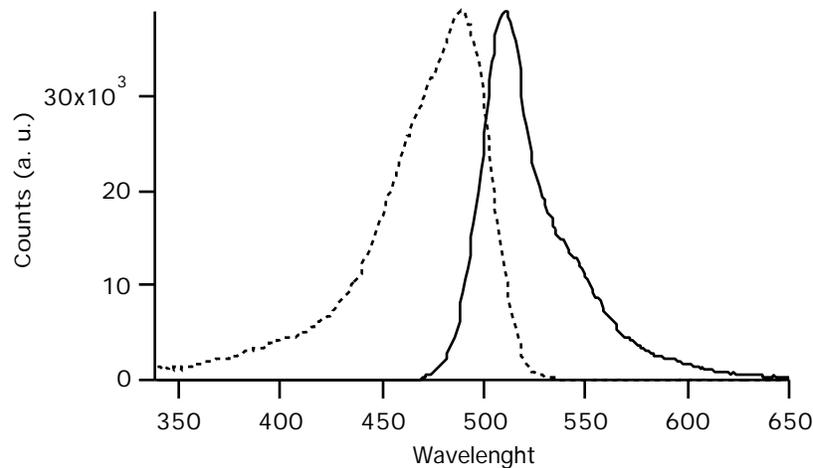


Figure II. 2 : Spectres d'excitation et d'émission de la GFP (S65T). Les spectres ont été effectués au laboratoire puis normalisés. La courbe pointillée correspond au spectre d'excitation ($\lambda_{em} = 505$ nm), la courbe continue au spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 480$ nm).

Les photons émis n'ont pas tous la même énergie. Celle-ci dépend du niveau vibrationnel de l'état fondamental dans lequel se trouve le fluorophore après sa désexcitation : le spectre d'émission rend compte des propriétés spectrales de la lumière émise. Le spectre d'émission de la GFP est présenté figure II. 2. Le spectre d'émission ne varie généralement pas en fonction de la longueur d'onde d'excitation. On observe un léger décalage vers le rouge du spectre lorsque l'on excite à l'extrême bordure rouge du spectre d'absorption. Cet effet rend compte des propriétés particulières d'interaction du fluorophore à l'état excité avec le solvant (Lakowicz, 1983).

Le spectre d'émission semble être l'image du spectre d'absorption à travers un miroir (Fig. II. 2). Le déplacement vers le rouge du spectre d'émission par rapport au spectre d'absorption correspond à la perte d'énergie entre photon absorbé et photon émis. Cet effet est connu sous le nom de déplacement de Stokes. Il s'explique par les relaxations vibrationnelles qui s'opèrent au sein du fluorophore durant le phénomène de fluorescence.

II. 1. 3. Rendement quantique

Le rendement quantique de fluorescence correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés par un fluorophore. En effet, lorsqu'un photon est absorbé, la molécule excitée peut revenir à son état fondamental par différents procédés non radiatifs comme la conversion interne ou l'extinction de fluorescence (voir Ch. II. 1. 4.). Le rendement quantique prend compte de la compétition entre le phénomène de désexcitation radiatif et les différents phénomènes de désexcitation non radiatifs. En considérant un diagramme de Perrin-Jablonski simplifié (Fig. II. 3), on peut associer deux vitesses de désexcitation, une radiative, k_r , et une non radiative, k_{nr} .

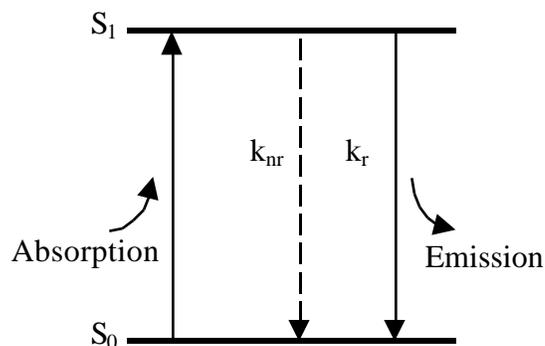


Figure II. 3 : Diagramme de désexcitation simplifié.

k_r et k_{nr} correspondent à la vitesse de désexcitation radiative et non radiative, respectivement.

Ces constantes de vitesse dépeuplent toutes deux l'état excité. Le rendement quantique, Q , peut se caractériser par :

$$Q = k_r / (k_r + k_{nr}) \quad (\text{II. 1. 2})$$

L'intensité de fluorescence d'une solution est ainsi proportionnelle à l'intensité d'excitation, à la concentration du fluorophore, à son coefficient d'extinction molaire, qui est une propriété intrinsèque de la molécule, et à son rendement quantique, qui, lui, varie en fonction du microenvironnement du fluorophore.

II. 1. 4. Extinction de fluorescence

L'extinction de fluorescence comprend au sens large tout phénomène diminuant l'intensité de fluorescence. Mis à part les effets de propriétés optiques (réabsorption, turbidité de la solution...) qui ne sont pas des phénomènes à l'échelle moléculaire, cette diminution de l'intensité de fluorescence peut avoir diverses signatures :

(i) – Le rendement quantique diminue, conséquence de l'augmentation de la vitesse de désexcitation non radiative. Par exemple:

- Le contact d'un fluorophore à l'état excité avec une molécule dite extinctrice (la plus connue est l'oxygène) désexcite le fluorophore sans émission de photons, k_{nr} augmente. La diminution est fonction de la probabilité de collision entre l'extincteur et le fluorophore qui dépend de la diffusion moléculaire de l'extincteur dans la solution, et donc de la viscosité du milieu, et de la concentration de l'extincteur.

- Le transfert d'énergie de fluorescence non radiatif (FRET) diminue le rendement quantique par l'augmentation de la constante de vitesse non radiative k_{nr} (voir détails Ch. II. 2).

(ii) – Le rendement quantique est constant. Dans ce cas, la diminution de l'intensité est une conséquence de la diminution du nombre de molécules fluorescentes. Par exemple:

- Le photoblanchiment est un phénomène irréversible de photodestruction des molécules à l'état excité qui diminue la concentration de fluorophores.

- La formation d'un complexe non fluorescent éteint également la fluorescence. La diminution de l'intensité correspond à la diminution de la concentration de molécules fluorescentes.

II. 1. 5. Durée de vie de fluorescence

Pour une population hétérogène de molécules fluorescentes, considérons le temps moyen de décroissance de la population de molécules excitées simultanément:

$$\langle t \rangle = \int_0^{\infty} t N(t) dt / \int_0^{\infty} N(t) dt \quad (\text{II. 1. 3})$$

où $N(t)$ est le nombre de molécules encore excitées au temps t .

Dans le cas d'une seule espèce moléculaire i.e. ayant les mêmes propriétés spectroscopiques, si nous considérons une population initiale N_0 de ce fluorophore dans l'état excité, la vitesse de dépopulation de l'état excité répond à l'équation

$$dN(t) = - (k_r + k_{nr}) N(t) dt \quad (\text{II. 1. 4})$$

où k_r et k_{nr} sont les constantes de vitesse radiative et non radiative définies plus haut pour ce fluorophore. L'équation II. 1. 4 s'intègre sous la forme

$$N(t) = N_0 \exp(- (k_r + k_{nr}) t) \quad (\text{II. 1. 5})$$

Dans ce cas, l'équation II. 1. 3 peut s'écrire sous la forme

$$\langle t \rangle = \int_0^{\infty} t \exp(- (k_r + k_{nr}) t) dt / \int_0^{\infty} \exp(- (k_r + k_{nr}) t) dt \quad (\text{II. 1. 6})$$

En intégrant par partie,

$$\langle t \rangle = (k_r + k_{nr})^{-1} = \tau \quad (\text{II. 1. 7})$$

où τ représente la durée de vie de fluorescence du fluorophore ayant un déclin monoexponentiel. La durée de vie de fluorescence se définit comme le temps moyen pendant lequel une molécule fluorescente demeure excitée. On peut noter que τ ne correspond pas au temps où la moitié des molécules se sont désexcitées. Ce n'est pas le temps de demi-vie. En fait, $N(\tau) = N_0 / e$. Au temps τ , 67 % des molécules se seront désexcitées quand 33 % des molécules se désexciteront à $t > \tau$. Il faut également souligner que cette notion de durée de vie est autant associée à la population qu'à un fluorophore isolé. Autrement dit, regarder le comportement d'une molécule unique ou d'une population est identique.

Il n'est pas possible de mesurer directement le nombre de molécules à l'état excité. Par contre, il est possible de mesurer le déclin de fluorescence après une brève excitation laser. Le rendement quantique, Q , correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de

photons absorbés (voir Ch. II. 1. 3.). Pour un intervalle de temps dt , dans le cas d'une population unique, le rendement quantique peut s'écrire sous la forme

$$Q = i(t) dt / (-dN(t)) \quad (\text{II. 1. 8})$$

où $i(t)$ correspond au déclin de fluorescence (déclins d'intensité). En dérivant $N(t)$ (Eq. II. 1. 4), on obtient

$$i(t) = Q^{-1} N_0 \exp(-t/\tau) \quad (\text{II. 1. 9})$$

En transformant l'équation II. 1. 2, on a $Q^{-1} = k_f$, et pour finir

$$i(t) = k_f N_0 \exp(-t/\tau) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (\text{II. 1. 10})$$

où I_0 est l'intensité mesurée au temps 0. La forme du déclin de fluorescence est exponentielle (Fig. II. 4), le mesurer permet de calculer la durée de vie de fluorescence comme l'inverse de la vitesse du déclin monoexponentiel.

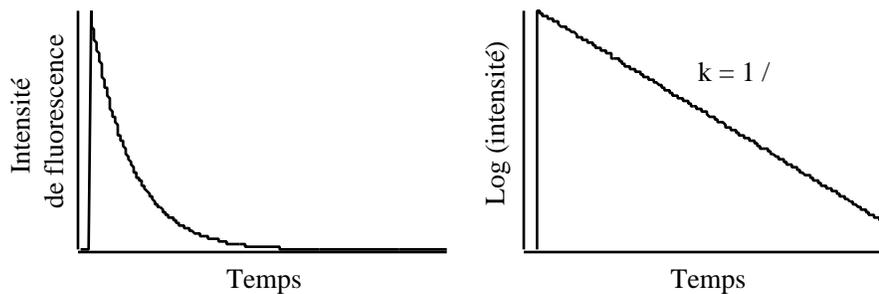


Figure II. 4 : Déclin de fluorescence.

Le même déclin est respectivement représenté selon un échelle linéaire ou logarithmique. La pente du déclin monoexponentiel à l'échelle logarithmique correspond à la somme de toutes les vitesses de désexcitation ou encore à l'inverse de la durée de vie.

II. 2. Transfert d'énergie de type Förster, le FRET

II. 2. 1. Processus de désexcitation par FRET

Le FRET participe à la dépopulation de l'état excité du donneur au même titre que les processus radiatifs et non radiatifs caractérisés précédemment. La durée de vie du donneur est directement liée au FRET.

II. 2. 1. 1. Vitesse de transfert

La figure II. 5 représente le diagramme des niveaux d'énergie associés au donneur et à l'accepteur lorsqu'il y a FRET. Quantitativement, le processus de transfert entre le donneur et l'accepteur peut se présenter sous la forme d'une vitesse de transfert, k_T .

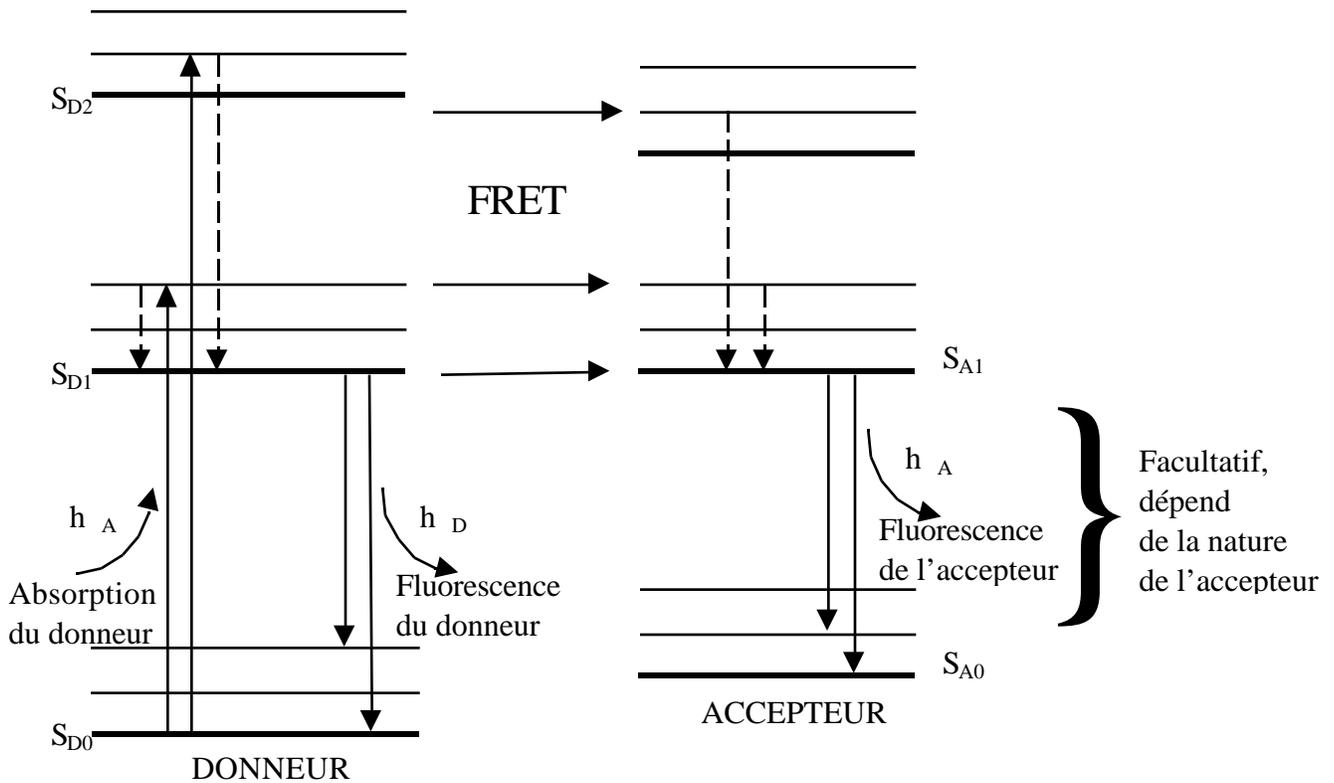


Figure II. 5 : Diagramme des niveaux d'énergie du donneur et de l'accepteur dans un mécanisme de FRET. En même temps que le donneur transfère son énergie à l'accepteur, il retourne à son état fondamental S_0 sans émission de photon.

C'est la caractéristique fondamentale décrivant le transfert d'énergie. On peut aussi représenter le FRET comme une réaction chimique entre donneur excité / accepteur à l'état fondamental et

donneur à l'état fondamental / accepteur excité, k_T représentant la constante de vitesse de la réaction (Fig. II. 6).

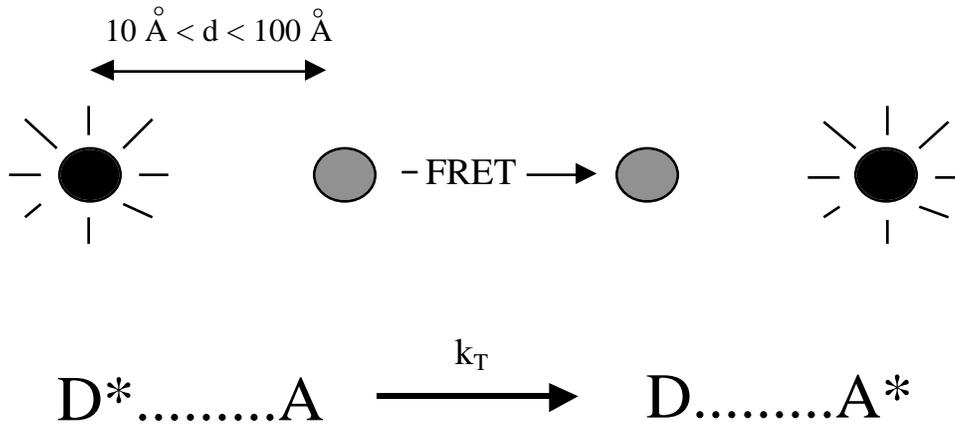


Figure II. 6 : Le FRET vu comme réaction chimique. C'est la réaction transformant les espèces donneur excité (D^*) et accepteur (A) vers les espèces donneur (D) et accepteur excité (A^*) qui caractérise le transfert d'énergie. A cette réaction correspond la constante cinétique k_T , vitesse de transfert.

La vitesse de désexcitation du donneur dépend donc de sa constante radiative intrinsèque, k_r , de sa constante non radiative en absence d'accepteur, k_{nr} , et de k_T . Le diagramme de Perrin-Jablonski simplifié est présenté figure II. 7. On peut écrire :

$$\tau_{DA} = (k_r + k_{nr} + k_T)^{-1} \quad (\text{II. 2. 1})$$

et sans transfert d'énergie (en absence d'accepteur, voir Chap. II. 1. 5)

$$\tau_D = (k_r + k_{nr})^{-1} \quad (\text{II. 2. 2})$$

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

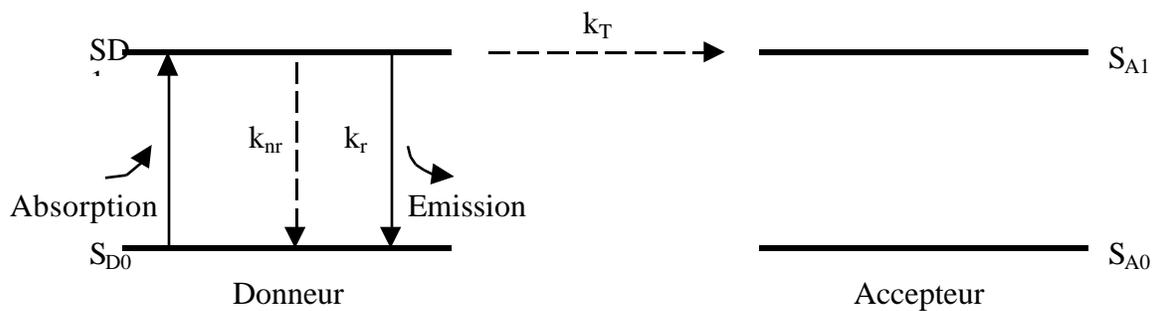


Figure II. 7 : Diagramme simplifié du phénomène de FRET. Sur ce diagramme sont représentées toutes les vitesses de désexcitation du donneur.

II. 2. 1. 2. Efficacité de transfert

L'efficacité de transfert se définit comme le rendement quantique du phénomène de transfert d'énergie. Par analogie avec le rendement quantique de fluorescence (nombre de photons émis sur nombre de photons absorbés, voir Ch. II. 1. 3), le rendement quantique de transfert correspond au nombre de molécules qui se désexcitent par transfert sur le nombre total de molécules excitées. Ainsi,

$$Q_T = k_T / (k_f + k_{nr} + k_T) \quad E \quad (\text{II. 2. 3})$$

où Q_T est le rendement quantique de FRET et E l'efficacité de FRET.

II. 2. 2. Théorie de Förster

Förster (Förster, 1948) a proposé un traitement quantique au phénomène d'interaction longue portée entre le dipôle de transition électronique d'émission du donneur et le dipôle de transition électronique d'absorption de l'accepteur. Le transfert d'énergie a lieu lorsque les deux dipôles rentrent en résonance. L'énergie d'interaction dipôle-dipôle décroît en fonction du cube de la distance entre les dipôles et dépend de leurs orientations relatives. La probabilité de transfert est proportionnelle au carré de l'énergie d'interaction. Ainsi, k_T décroît en $1/R^6$, R étant la distance entre le donneur et l'accepteur, et répond à l'équation suivante :

$$k_T = (9 (\ln 10)^{-2} Q_D J) / (128 \pi^5 N n^4 \tau_D R^6) \quad (\text{II. 2. 4})$$

où Q_D et τ_D sont le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence du donneur; N représente le nombre d'Avogadro; n est l'indice de réfraction du milieu; J représente quantitativement le recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur (Fig. II. 8); et τ_D est

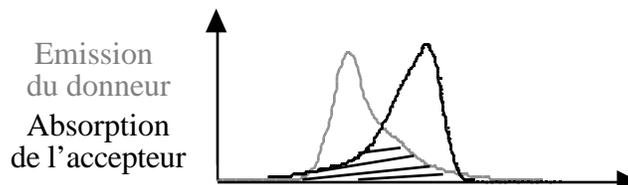


Figure II. 8 : Recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. Ce recouvrement est essentiel à la possibilité de transfert entre le donneur et l'accepteur. Sa quantification, J , intervient dans la quantification du FRET. Toutes choses égales par ailleurs, plus J est grand et plus le FRET est important, et réciproquement.

le facteur d'orientation qui rend compte de l'orientation mutuelle entre les dipôles électroniques d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. On a :

$$J = F_D(\lambda) \cdot A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d / F_D(\lambda) \cdot d \quad (\text{II. 2. 5})$$

où λ représente la longueur d'onde, $F_D(\lambda)$ est le spectre d'émission du donneur et $A(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur à la longueur d'onde λ , et

$$= \cos^2 \theta_T - 3 \cos^2 \theta_A \cos^2 \theta_D \quad (\text{II. 2. 6})$$

où θ_T est l'angle entre les dipôles électroniques d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, θ_D et θ_A les angles entre le vecteur normalisé reliant le donneur à l'accepteur et les dipôles électroniques d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, respectivement (Fig. II. 9). Il est

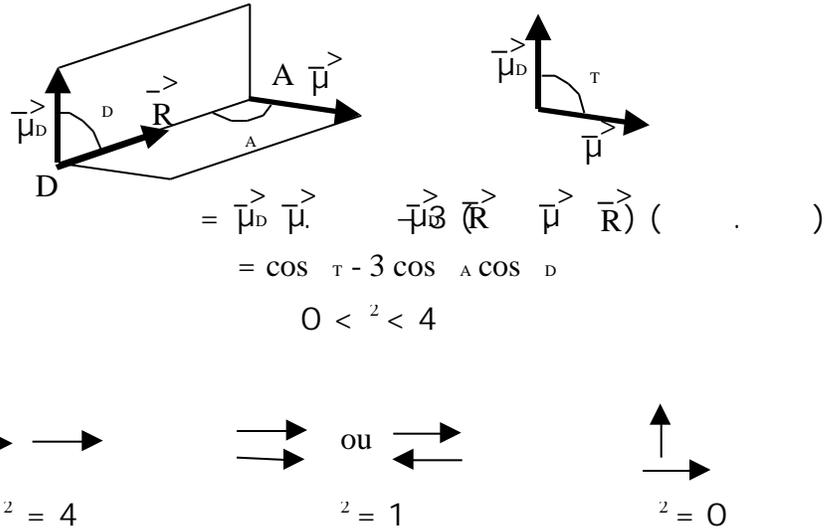


Figure II. 9 : Signification géométrique de K_T , le facteur d'orientation.

aussi présenté figure II. 9 quelques cas particuliers de la valeur de ce facteur d'orientation qui sera discuté au chapitre II. 2. 4.

Pour simplifier, k_T s'écrit sous la forme

$$k_T = k_D^{-1} (R_0 / R)^6 \quad (\text{II. 2. 7})$$

où R_0 correspond à la distance de Förster, i. e. distance où il y a 50 % d'efficacité de transfert, soit $k_T = k_r + k_{nr} = 1 / \tau_D$. On a alors :

$$R_0 = (8.79 \cdot 10^{-5} J Q_D n^4 \tau_D)^{1/6} \text{ (en } \text{Å}) \quad (\text{II. 2. 8})$$

En combinant les équations II. 2. 3 et II. 2. 7, on peut écrire

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (\text{II. 2. 9})$$

Cette équation est caractéristique du lien entre le traitement théorique du FRET et l'expérience. La mesure expérimentale du FRET correspond à la détermination de l'efficacité de transfert. On observe que cette efficacité de transfert se modélise à partir du traitement théorique de Förster qui permet de déterminer la distance entre le donneur et l'accepteur.

Le traitement du phénomène de FRET par mécanique ondulatoire (Van Der Meer et al., 1994) donne des résultats comparables.

II. 2. 3. Mesure du FRET

Dans la suite de ce chapitre, différentes méthodes pour mesurer le FRET expérimentalement sont présentées. Les principes expérimentaux sont énoncés pour un échantillon où la situation moléculaire est homogène. Les problèmes expérimentaux, la comparaison de ces mesures et la discussion de leur interprétation seront présentés chapitre II. 2. 4.

II. 2. 3. 1. Intensité de fluorescence

A partir de l'équation II. 2. 3, le rendement quantique de transfert, i. e. l'efficacité de transfert, peut s'écrire sous la forme :

$$E = k_T / (k_r + k_{nr} + k_T) = 1 - (k_r + k_{nr}) / (k_r + k_{nr} + k_T) = 1 - Q_{DA} / Q_D \quad (\text{II. 2. 10})$$

où Q_D et Q_{DA} sont les rendements quantiques du donneur respectivement en absence et en présence d'accepteur. Une efficacité apparente de transfert peut être obtenue en assimilant le rapport des intensités de fluorescence stationnaire du donneur en présence et en absence de l'accepteur à celui des rendements quantiques :

$$E_{app} = 1 - F_{DA} / F_D \quad (\text{II. 2. 11})$$

L'équation II. 2. 10 est toujours vraie. Par contre, pour que l'équation II. 2. 11 soit vraie, les intensités mesurées doivent être comparables (même concentration de donneur, même mode

expérimental pour l'excitation et l'émission, pas de contribution de fluorescence de l'accepteur).

Par ailleurs, E_{app} n'est pas forcément égal à E (voir Ch. II. 2. 4. 2).

II. 2. 3. 2. Durée de vie du donneur

L'équation II. 2. 3 peut s'écrire également :

$$E = 1 - \tau_{DA} / \tau_D \quad (\text{II. 2. 12})$$

où τ_{DA} et τ_D sont définis par les équations II. 2. 1 et II. 2. 2. Au contraire des intensités, la mesure de la durée de vie est indépendante des concentrations de molécules ce qui facilite l'interprétation des résultats, plus particulièrement en cellule. En combinant les équations II. 2. 9 et II. 2. 12, on a :

$$\tau_{DA} = \tau_D / (1 + (R_0 / R)^6) \quad (\text{II. 2. 13})$$

Cette équation correspond à la variation de la durée de vie du donneur en fonction de la distance entre le donneur et l'accepteur. La figure II. 10 présente cette variation sous la forme d'une courbe.

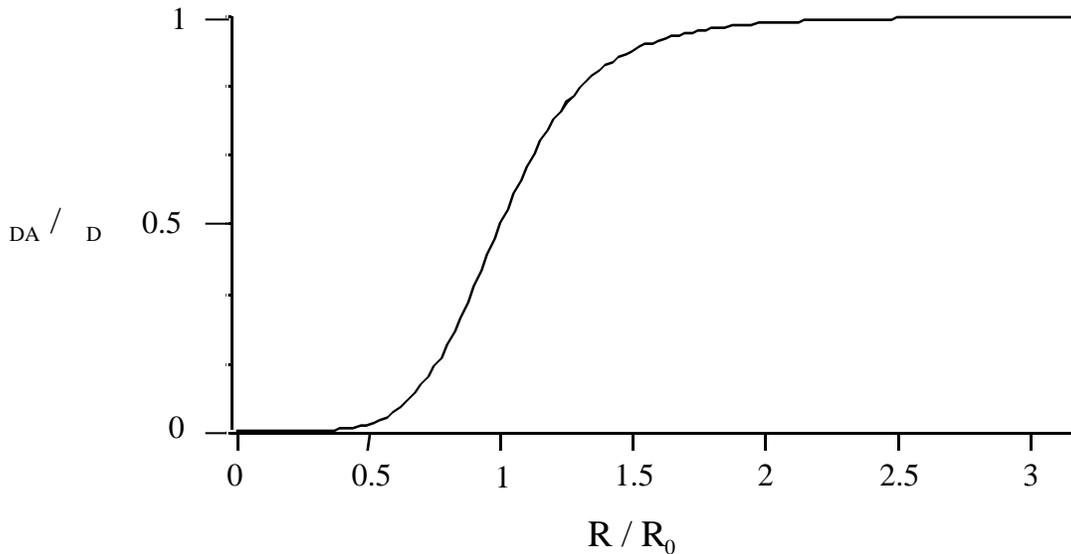


Figure II. 10 : Variation de la durée de vie du donneur en fonction de sa distance avec l'accepteur.

τ_D correspond à la durée de vie du donneur seul, τ_{DA} à sa durée de vie en présence d'accepteur, R à la distance entre les deux chromophores et R_0 à la distance de Förster.

II. 2. 3. 3. Cinétique de fluorescence de l'accepteur

Dans le cas où l'accepteur est un fluorophore, il est possible de caractériser le transfert d'énergie par la cinétique de fluorescence de l'accepteur. En considérant le diagramme de désexcitation figure II. 7, pour un intervalle de temps dt , on pose :

$$dA(t) = k_T D(t) dt - k_A A(t) dt \quad (\text{II. 2. 14})$$

où $A(t)$ et $D(t)$ sont respectivement le nombre de molécules acceptrices et donneuses excitées au temps t , k_T et k_A les constantes de vitesse du FRET et de la fluorescence de l'accepteur (somme des désexcitations radiatives et non radiatives), respectivement. Avec $D(t) = D_0 \exp(- (k_D + k_T) t)$ (Eq. II. 1 5), où D_0 est le nombre de donneurs excités au temps 0 et k_D la constante de vitesse de fluorescence du donneur en absence de transfert, l'équation II. 2. 14 s'intègre sous la forme

$$A(t) = [k_T D_0 / (k_D + k_T - k_A)] [Cste \exp(- k_A t) - \exp(- (k_D + k_T) t)] \quad (\text{II. 2. 15})$$

En posant $A(0) = A_0$ où A_0 représente le nombre d'accepteurs excités au temps 0, la constante d'intégration se calcule et

$$A(t) = [k_T D_0 / (k_D + k_T - k_A)] \{ [1 + (k_D + k_T - k_A) A_0 / k_T D_0] \exp(- k_A t) - \exp(- (k_D + k_T) t) \} \quad (\text{II. 2. 16})$$

Comme présenté au chapitre II. 1. 5, la cinétique de dépopulation est exactement proportionnelle au déclin de fluorescence. Un exemple théorique de cinétique de fluorescence de l'accepteur dans une expérience de FRET avec $A_0 = 0$ est présenté figure II. 11. La montée est caractéristique du transfert d'énergie.

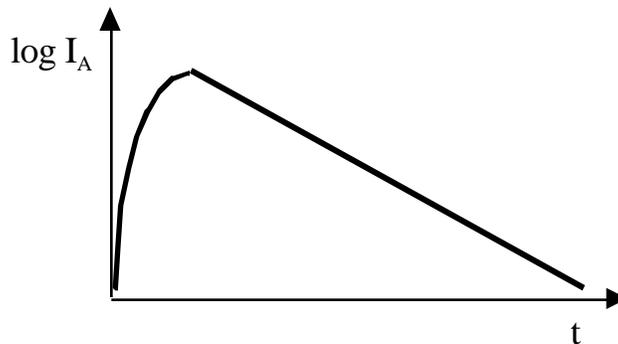


Figure II. 11 : Modélisation théorique de la cinétique de l'accepteur dans une expérience de FRET. Dans cet exemple théorique, A_0 , le nombre de molécules acceptrices excitées initialement est nul. Le phénomène de FRET a sa signature dans la croissance de cette cinétique aux temps courts.

II. 2. 3. 4. Cinétique de photoblanchiment

Le photoblanchiment, phénomène irréversible, affecte les molécules fluorescentes à l'état excité. Cela correspond à la destruction du fluorophore, donc à une perte des propriétés d'émission de lumière. Pour une population de fluorophore, la cinétique de photoblanchiment correspond à la diminution de l'intensité de fluorescence suite à cette photodestruction. Cette cinétique suit une loi de décroissance exponentielle avec une durée de vie de photoblanchiment τ_{bl} . Cette durée de vie est directement affectée par la durée de vie de fluorescence, et donc, par tout processus influant sur ce paramètre comme le FRET. Plus la durée de vie de fluorescence diminue, plus la probabilité que le fluorophore soit à l'état excité, donc la probabilité qu'il soit dégradé diminue. La vitesse de photoblanchiment diminue et τ_{bl} augmente. L'efficacité de transfert peut donc se caractériser par :

$$E = 1 - \tau_{blD} / \tau_{blDA} \quad (\text{II. 2. 17})$$

où τ_{blD} et τ_{blDA} sont les durées de vie de photoblanchiment en absence et en présence d'accepteur, respectivement. Cette technique a été utilisée pour une étude menée en cellules (Bastiaens & Jovin, 1996).

II. 2. 4. Mesure, orientation, distance et FRET : la complexité de l'interprétation

Les différentes méthodes expérimentales pour mesurer le FRET ne sont pas équivalentes lorsque les concentrations de donneurs et d'accepteurs ne sont pas contrôlées (par exemple en cellules) ou lorsqu'il s'agit de modéliser le plus précisément les distances entre le donneur et l'accepteur. Dans ce chapitre, il est question de comparer et de présenter les limitations des différentes méthodes pour la mesure de l'efficacité de transfert.

II. 2. 4. 1. Effet des variations de concentration sur les mesures

Nous avons vu au chapitre II. 2. 3. 1 qu'une efficacité de transfert pouvait être mesurée par les variations d'intensité de fluorescence stationnaire du donneur lorsqu'il transfère son énergie à l'accepteur. Cette méthode requiert que (i) les concentrations du donneur et (ii) les conditions expérimentales de mesure des fluorescences du donneur, soient les mêmes en absence et en

présence d'accepteur. Si ces conditions peuvent être facilement respectées pour des mesures en cuvette, il n'en est pas de même pour des mesures en cellule vivante. En effet, le volume subcellulaire, le trajet optique de la lumière sont des paramètres qui ne sont pas bien contrôlés dans les études sous microscope. De plus, pour des études d'interaction protéine-protéine le taux d'expression de protéine (en l'occurrence la protéine étiquetée avec le fluorophore donneur) varie d'une cellule à l'autre, ce qui rend pratiquement impossible les mesures relatives de fluorescence du donneur en absence d'accepteur (mono-transfection) et en présence d'accepteur (co-transfection dans une culture de cellules en parallèle). Il existe cependant des situations où il est possible de mesurer des variations de fluorescence du donneur sur un même échantillon cellulaire, variations correspondant à la variation d'efficacité de transfert. C'est ce qui a été entrepris dans les premières études de FRET utilisant des protéines fusionnées avec la GFP (Heim & Tsien, 1996, Miyawaki et al., 1997).

Dans le cas d'un accepteur fluorescent, une diminution de la fluorescence du donneur doit s'accompagner d'une mise en évidence de la fluorescence de l'accepteur. La mesure du rapport des intensités de fluorescence de l'accepteur et du donneur lorsque l'on excite le donneur permet d'être plus sélectif dans la mesure de FRET. En épifluorescence sous microscope, l'accepteur est pratiquement toujours légèrement excité lorsque l'on excite le donneur. De même, lorsque l'on sélectionne la fluorescence de l'accepteur, il est difficile de couper complètement la contribution du donneur. Dans ce cas, c'est une augmentation de fluorescence de l'accepteur de façon concomitante à la diminution de la fluorescence du donneur qui sera mesurée. Cette méthode requiert comme précédemment d'effectuer les mesures d'intensité de fluorescence dans les deux situations de FRET et non FRET, où les concentrations du donneur ainsi que celles de l'accepteur sont les mêmes. Une amélioration a consisté à photoblanchir l'accepteur après une première mesure de l'intensité du donneur, puis à mesurer une seconde fois l'intensité du donneur (Llopis et al., 2000, Wouters et al., 1998). Ainsi, cette méthode permet de mesurer l'intensité du donneur en présence et en absence d'accepteur à la même concentration. En cas de FRET, l'intensité du donneur sera plus élevée avant qu'après le photoblanchiment de l'accepteur. Eventuellement, la destruction partielle du

donneur par ce photoblanchiment aura comme conséquence de diminuer l'efficacité apparente du FRET mais ne générera pas de "faux positifs". Néanmoins, cette technique a l'inconvénient de ne pas convenir à un suivi en cellules.

Au contraire de ces mesures, la mesure du déclin de fluorescence du donneur est indépendante de la concentration. En d'autres termes, détecter une augmentation globale de la vitesse de désexcitation, ce qui revient à mesurer une durée de vie plus courte, est constitutif du phénomène de FRET. Il est donc possible par la mesure des déclin de fluorescence du donneur de comparer une situation avec et sans accepteur dans des échantillons cellulaires différents dont on ne maîtrise pas les concentrations de donneur et d'accepteur.

II. 2. 4. 2. Effet des variations de pourcentage du donneur en interaction sur les mesures

En cellules, la mesure de l'interaction entre deux protéines hétérologues par FRET requiert la co-transfection de deux plasmides contenant chacun les gènes codant pour les protéines d'intérêt fusionnées à des protéines autofluorescentes différentes. Les niveaux d'expression de chaque protéine ne sont pas contrôlables, comme nous l'avons vu. Ceci a pour conséquence, outre que les concentrations subcellulaires de ces protéines varient d'une cellule à l'autre, que la protéine portant le fluorophore donneur peut être sur-exprimée par rapport à la protéine portant le fluorophore accepteur. Dans ce cas, même si l'interaction entre les deux protéines est forte, une fraction du donneur (correspondant aux protéines en excès) ne transférera pas d'énergie à l'accepteur. La mesure des intensité de fluorescence stationnaire ne permet pas de distinguer les deux populations du donneur, celle en interaction et celle qui ne l'est pas. Cette méthode permet seulement de mesurer une efficacité apparente de FRET, qui ne sera égale à l'efficacité intrinsèque de FRET que si 100% des protéines donneuses sont en interaction avec les protéines acceptrices.

Par contre, l'étude du déclin de fluorescence du donneur permet théoriquement de caractériser une distribution de durées de vie (Fig. II. 12). Dans le cas simple d'un donneur ayant une unique durée de vie (déclin mono-exponentiel), s'il existe deux populations de donneurs, l'une présentant un transfert et l'autre pas, alors le déclin se présente comme une courbe bi-exponentielle.

La durée de vie longue correspond à la durée de vie du donneur seul. La durée de vie courte permet de calculer l'efficacité de transfert et donc la distance entre le donneur et l'accepteur pour les chromophores donneurs présentant un transfert. Le rapport des coefficients pré-exponentiels correspond au rapport de concentrations entre les deux populations (Fig. II. 12). Aussi, la mesure de FRET par déclin de fluorescence est-elle plus précise et se trouve-t-elle particulièrement adaptée à des études en cellules vivantes.

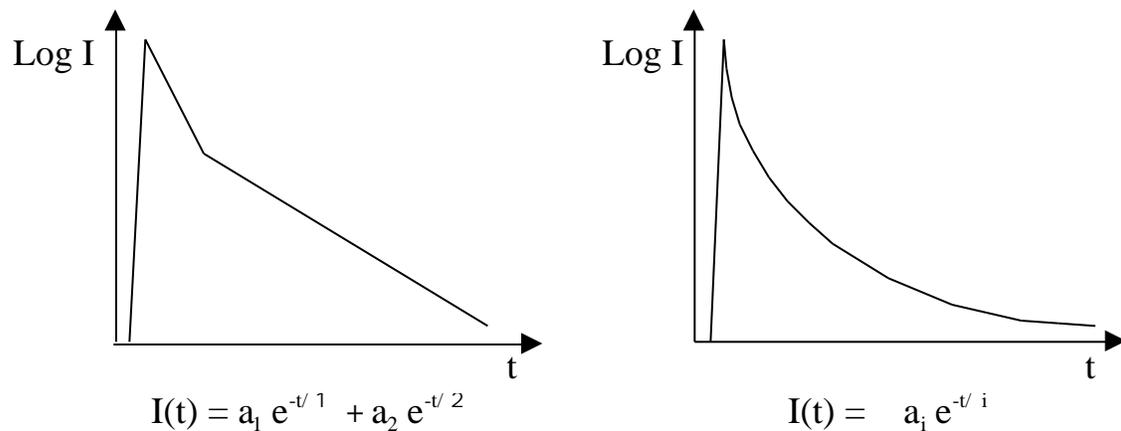


Figure II. 12 : Représentation théorique de populations hétérogènes de chromophores dans une expérience de FRET.

Ici, deux cas sont représentés : deux sous-populations discrètes représentées par un déclin bi-exponentiel et une population présentant une distribution d'efficacité de transfert soit par une distribution de distance, soit par une distribution d'orientation entre donneur et accepteur représentée par une distribution de durée de vie.

II. 2. 4. 3. Autofluorescence cellulaire

Caractériser le FRET par le déclin du donneur correspond à mesurer une durée de vie plus courte dans ce déclin. L'identification d'une durée de vie courte associée au FRET peut être problématique à cause de l'existence d'une espèce fluorescente ayant cette même durée de vie. Dans des expériences menées en cellule, c'est le cas de l'autofluorescence cellulaire (comme le NADH, et les lipofuchines). Des expériences de contrôle sont alors nécessaires pour exclure la contribution de l'autofluorescence. La méthode consistant à mesurer la cinétique de fluorescence de l'accepteur se révèle plus puissante. En effet, la montée caractéristique du FRET dans cette cinétique ne peut pas

provenir de l'autofluorescence cellulaire, renforçant considérablement la sensibilité de la mesure et ses limitations expérimentales.

II. 2. 4. 4. Le facteur d'orientation comme limitation de la mesure de distance

La vitesse de transfert pour un même couple donneur–accepteur ne dépend pas uniquement de la distance entre les chromophores mais aussi du facteur d'orientation κ^2 . Ce facteur varie entre 0 et 4 selon les orientations respectives du dipôle d'émission du donneur, du dipôle d'absorption de l'accepteur et du vecteur reliant les deux dipôles (Fig. II. 9). Pour une situation de distribution isotrope des différentes orientations, on prend la valeur moyenne $\langle \kappa^2 \rangle = 2 / 3$. Dans ce cas, le facteur d'orientation n'est plus une limitation à la détermination de la distance entre les deux chromophores à partir de la vitesse de transfert. Dans le cas d'une orientation fixe, calculer la distance requiert la détermination de κ^2 . Il n'existe pas d'outils expérimentaux pour déterminer ce facteur. Même en observant la dépolarisation de fluorescence (voir Ch. II. 3) du donneur et de l'accepteur, il n'est pas possible de déterminer précisément ce paramètre (Dale et al., 1979).

Pour les protéines fusionnées à la GFP, la modélisation moléculaire de la structure tertiaire serait un outil de prédiction utile pour fixer le facteur d'orientation. Une autre approche consiste à construire des protéines fusion avec une séquence d'acides aminés de liaison entre la protéine d'intérêt et la protéine autofluorescente. La flexibilité de cette séquence permettrait une distribution de l'orientation des deux chromophores entre eux. Dans ce cas, il devient raisonnable de proposer une modélisation des résultats expérimentaux avec $\langle \kappa^2 \rangle = 2 / 3$.

Dans tous les cas, le facteur d'orientation est une limitation au calcul de la distance R entre les chromophores. Globalement, les résultats expérimentaux peuvent se caractériser par un modèle proposant une interprétation moléculaire (R, κ^2) à la mesure expérimentale de E . En aucun cas ce modèle n'est exclusif. Ce n'est qu'une interprétation du transfert d'énergie expérimentalement mesuré.

Il convient de ne pas confondre le FRET avec le phénomène de réabsorption. Dans le cas de la réabsorption, le transfert est radiatif et correspond à la réabsorption d'un photon de fluorescence par une autre molécule (identique ou non). Phénoménologiquement, ces deux transferts se distinguent par des propriétés opposées. Alors que la réabsorption dépend de la géométrie et des dimensions du chemin optique de la mesure, le FRET en est insensible. Pour le FRET, la durée de vie du donneur diminue, son spectre d'émission est inchangé et son efficacité peut dépendre de la viscosité du milieu, alors que l'inverse est vrai pour la réabsorption (Steinberg, 1971). Il est également intéressant de noter que la fluorescence n'est pas l'unique approche expérimentale pour observer le FRET : tout autre processus se produisant à partir de l'état excité du donneur serait affecté par le FRET (Clegg, 1992).

II. 3. Dépolarisation de la fluorescence émise, déclin d'anisotropie

II. 3. 1. Anisotropie et photosélection des fluorophores à l'excitation

La mesure de l'anisotropie de fluorescence, r , est illustrée figure II. 13. Elle se définit par

$$r = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + 2 I_{\perp}) \quad (\text{II. 3. 1})$$

où $I_{//}$ et I_{\perp} correspondent à l'intensité de fluorescence émise dont la polarisation est respectivement parallèle et perpendiculaire à la polarisation de la lumière d'excitation. En d'autres termes, c'est aussi le rapport entre la différence de ces deux intensités caractéristiques de l'anisotropie et l'intensité totale. En effet, le dénominateur correspond à la somme des intensités suivant les trois axes de l'espace, I_x , I_y et I_z (Fig. II. 13). Dans le cas où la lumière d'excitation est polarisée suivant I_z , on a $I_x = I_y = I_{\perp}$. L'équation II. 3. 1 s'écrit aussi

$$r = (I_z - I_x) / (I_x + I_y + I_z) = (I_z - I_x) / I_T \quad (\text{II. 3. 2})$$

où I_T , l'intensité totale, est indépendante des effets de polarisation.

Dans le cas d'une lumière complètement polarisée, comme la diffraction d'une lumière polarisée, $I_{\perp} = 0$ et $r = 1$. Cette valeur maximale n'est jamais trouvée pour la fluorescence. A cause de la dépendance angulaire de la photosélection à l'excitation, les valeurs sont plus petites.

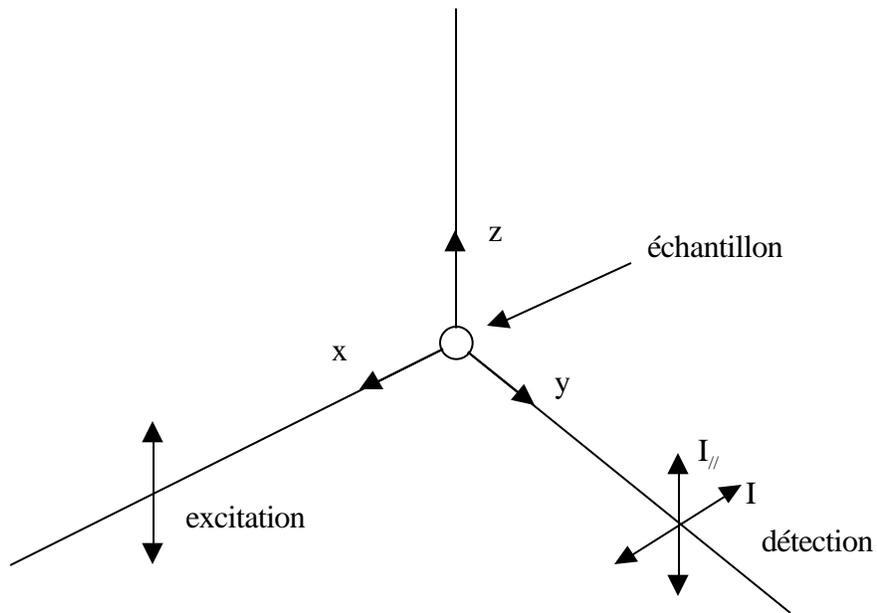


Figure II. 13 : Représentation géométrique de la mesure d'anisotropie.

On peut exprimer r sous une autre forme. La figure II. 14 présente le fluorophore sous la forme d'un dipôle oscillant représenté par un vecteur formant un angle θ avec z et un angle ϕ avec x dans le plan (xy) .

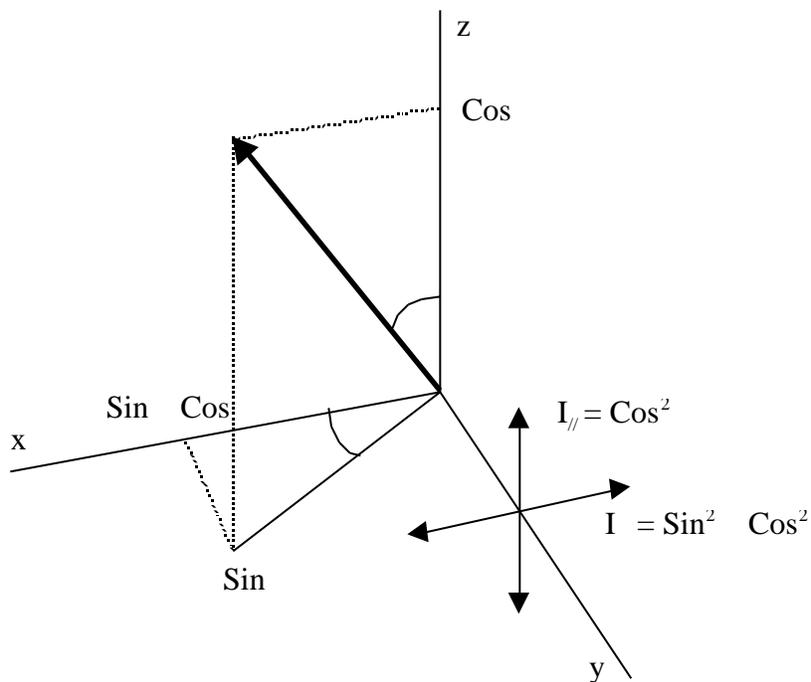


Figure II. 14 : Anisotropie de fluorescence d'un dipôle.

Le dipôle fait un angle θ avec l'axe z et un angle ϕ avec l'axe x dans le plan (x, y) . L'intensité récoltée suivant l'axe x et z correspond au carré de la projection de ce dipôle suivant ces directions.

L'intensité de la lumière émise par un dipôle est proportionnelle au carré de la projection de son vecteur suivant l'axe d'observation. On a :

$$I_{//}(\theta, \phi) = \cos^2 \theta \quad (\text{II. 3. 3})$$

et

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2 \theta \cos^2 \phi \quad (\text{II. 3. 4})$$

Dans les expériences d'anisotropie, la lumière d'excitation est polarisée suivant z. La probabilité d'excitation des fluorophores dont l'orientation est distribuée aléatoirement dans l'espace est indépendante de l'angle ϕ . On a alors :

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \int_0^\pi \cos^2 \theta \sin \theta \, d\theta / \int_0^\pi \sin \theta \, d\theta = 1/2 \quad (\text{II. 3. 5})$$

Les équations II. 3. 3 et II. 3. 4 deviennent alors :

$$I_{//}(\theta) = \cos^2 \theta \quad (\text{II. 3. 6})$$

$$I_{\perp}(\theta) = 1/2 \sin^2 \theta \quad (\text{II. 3. 7})$$

En substituant dans l'équation II. 3. 1, l'anisotropie s'écrit sous la forme

$$r = (3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1) / 2 \quad (\text{II. 3. 8})$$

avec

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \int_0^\pi \cos^2 \theta \, p(\theta) \, d\theta / \int_0^\pi p(\theta) \, d\theta \quad (\text{II. 3. 9})$$

où $p(\theta)$ correspond à la probabilité d'émission d'un photon par un dipôle faisant un angle θ avec l'axe z.

En étudiant le cas théorique particulier d'une solution diluée de fluorophores parfaitement immobiles, dont l'orientation est distribuée aléatoirement dans l'espace, et ayant leurs dipôles d'excitation et d'émission parallèles, on aura des informations sur la compréhension des valeurs d'anisotropie de fluorescence et de ses propriétés fondamentales. En effet, dans ce cas, $p(\theta)$ correspond simplement à la description de la photosélection à l'excitation. C'est le cas où la valeur de r est maximale. La probabilité d'absorption d'une molécule fluorescente excitée par une lumière polarisée suivant z est proportionnelle à $\cos^2 \theta$. Pour une distribution aléatoire, le nombre de molécules ayant une orientation dipolaire entre θ et $\theta + d\theta$ est proportionnel à $\sin \theta \, d\theta$. On a alors :

$$p(\theta) \, d\theta = \cos^2 \theta \sin \theta \, d\theta \quad (\text{II. 3. 10})$$

et l'équation II. 3. 8 nous donne $r = 2/5$ qui est la valeur maximale de l'anisotropie de fluorescence, consécutive de la dépendance en \cos^2 pour la photosélection à l'excitation.

Dans le cas où le dipôle d'absorption fait un angle avec le dipôle d'émission, pour une population de fluorophores immobiles aléatoirement distribués, l'anisotropie est le produit de la perte due à la photosélection (2/5) par la perte due au déplacement angulaire de l'émission, qui, suivant l'équation II. 3. 8, s'écrit sous la forme $1/2 (3 \cos^2 - 1)$. Cette anisotropie, correspondant à une distribution aléatoire de molécules immobiles, s'écrit r_0 , comme anisotropie maximale ou anisotropie initiale (voir Ch. II. 3. 2) et on a :

$$r_0 = 1/5 (3 \cos^2 - 1) \quad (\text{II. 3. 11})$$

II. 3. 2. Déclins d'anisotropie

En mesurant les déclins de fluorescence parallèlement et perpendiculairement à une excitation pulsée polarisée, l'anisotropie de fluorescence, $r(t)$, s'écrit

$$r(t) = (I_{//}(t) - I_{\perp}(t)) / (I_{//}(t) + 2 I_{\perp}(t)) = (I_{//}(t) - I_{\perp}(t)) / I_T(t) \quad (\text{II. 3. 12})$$

où $I_{//}(t)$ et $I_{\perp}(t)$ sont les déclins de fluorescence parallèle et perpendiculaire à l'excitation et $I_T(t)$ est le déclin total sans effet de polarisation. A ce sujet, lorsque l'on mesure les déclins avec une lumière polarisée (par exemple un laser), il est possible de mesurer directement $I_T(t)$ en plaçant un analyseur à $54,7^\circ$ de la polarisation d'excitation (angle magique). Dans ce cas, sachant que l'intensité est proportionnelle au carré de la projection du dipôle suivant l'axe d'observation et que $2 \cos^2 (54,7) = \sin^2 (54,7)$, l'intensité récoltée correspond à $I_{//}(t) + 2 I_{\perp}(t)$.

Généralement, $r(t)$ décroît et correspond à la dépolarisation de la lumière dans le temps de la fluorescence. Ce déclin d'anisotropie correspond à la perte de mémoire de l'orientation initiale du système. Tout événement à l'échelle moléculaire qui a pour effet de réorienter le dipôle d'émission à l'état excité intervient dans cette dépolarisation. L'équation II. 3. 12 s'écrit aussi sous la forme

$$I_{//}(t) = 1/3 I_T(t) (1 + 2 r(t)) \quad (\text{II. 3. 13})$$

et

$$I_{\perp}(t) = 1/3 I_T(t) (1 - r(t)) \quad (\text{II. 3. 14})$$

Au temps $t = 0$, aucun événement à l'échelle moléculaire n'a eu lieu, les molécules qui réémettent un photon sont considérées immobiles, et $r(0) = r_0$ (Eq. II. 3. 11).

Il est important de noter que, pour un mélange de différents fluorophores, la somme des anisotropies ne correspond pas à l'anisotropie de la somme. Le déclin d'anisotropie n'est pas associatif. En d'autres termes, pour n espèces moléculaires différentes, on a

$$r(t) = \frac{\sum d_i(t) r_i(t)}{\sum d_i(t)} \quad (\text{II. 3. 15})$$

où $d_i(t)$ et $r_i(t)$ sont le déclin de fluorescence et l'anisotropie de l'espèce i , respectivement.

II. 3. 3. Effet de la diffusion rotationnelle sur l'anisotropie

La première cause de dépolarisation de la fluorescence est la diffusion rotationnelle des fluorophores. Après le pulse laser, les molécules excitées tournent par mouvements browniens, et la fluorescence émise a perdu la mémoire de l'orientation initiale caractéristique de la photosélection à l'excitation (Fig. II. 15).

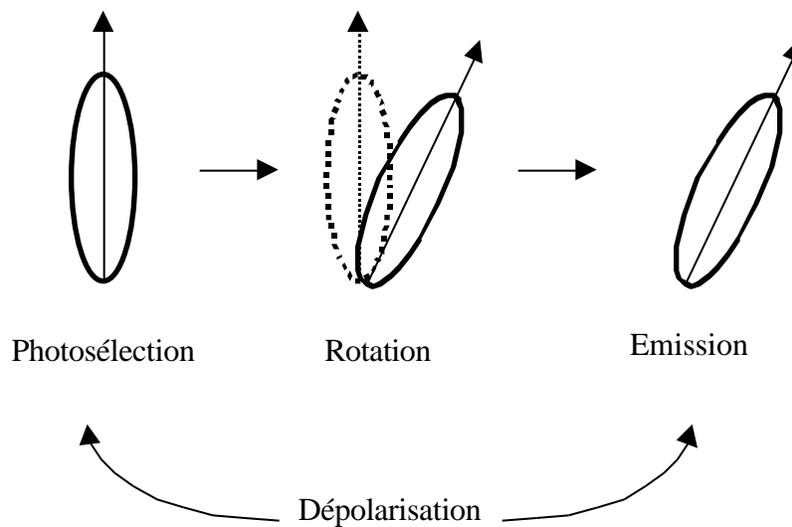


Figure II. 15 : Dépolarisation de la fluorescence par rotation du chromophore.

En tournant, le dipôle d'émission du chromophore change d'orientation et la lumière émise est désorientée par rapport à l'excitation. Pour une population de chromophores orientés par photosélection à l'excitation, les différents mouvements Browniens induisent une désorientation des dipôles et donc une dépolarisation de la fluorescence.

Dans le cas simple d'une molécule sphérique, l'anisotropie décroît mono-exponentiellement suivant l'équation :

$$r(t) = r_0 \exp(-t / \tau) \quad (\text{II. 3. 16})$$

où r_0 , l'anisotropie initiale, est définie équation II. 3. 11 et τ représente le temps de corrélation rotationnelle. Qualitativement, plus τ est petit et plus la molécule tourne vite, et inversement. τ correspond à l'inverse de six fois le coefficient de diffusion rotationnelle. Quantitativement, ce coefficient de diffusion pour une molécule sphérique est décrit par la loi de Stokes-Einstein et dépend de la température, T , de la viscosité du milieu, η , et du volume apparent de la sphère, V . On a :

$$\tau = V / RT \quad (\text{II. 3. 17})$$

où R est la constante de Boltzman.

Dans le cas plus complexe d'une ellipse, le déclin d'anisotropie devient bi-exponentiel. En théorie, une molécule asymétrique peut être décrite par plusieurs coefficients de diffusion rotationnelle, ce qui implique un déclin d'anisotropie multi-exponentiel. En pratique, il devient très difficile de résoudre plus de deux temps de corrélation dans un déclin d'anisotropie. Le modèle choisi devient un simplificateur du volume apparent de la molécule étudiée.

Le déclin d'anisotropie peut aussi caractériser une rotation restreinte, comme par exemple le mouvement local d'une partie de la protéine. Dans ce cas, il demeure une anisotropie résiduelle aux temps longs caractéristique du cône de restriction dans lequel les mouvements ont lieu. On a par exemple :

$$r(t) = (r_0 - r_{\infty}) \exp(-t / \tau) + r_{\infty} \quad (\text{II. 3. 18})$$

où r_{∞} correspond à l'anisotropie résiduelle.

Il demeure une limitation intrinsèque à cette approche expérimentale de l'étude des déclins d'anisotropie. Dans le cas où les mouvements sont considérablement longs (grosse molécule ou forte viscosité) par rapport au déclin de la fluorescence ($\tau \ll \tau_f$), l'anisotropie mesurée par fluorescence $r(t) \approx r_0$ et il est impossible de décrire cette situation. A l'inverse, pour des mouvements très rapides par rapport à la durée de vie ($\tau \gg \tau_f$), $r(t) \approx 0$. Bernard Valeur définit la fenêtre

expérimentale de temps, $10^{-10} < t < 10^{-9}$, comme la vie publique du fluorophore, comprise entre la vie privée et la mort (Valeur, 1993).

II. 3. 4. Effet du FRET entre chromophores identiques, l'homoFRET, sur l'anisotropie

La figure II. 16 schématise la dépolarisation de la fluorescence dans le temps de la durée de vie par homoFRET. Dans le cas de sauts d'énergie multiples où l'organisation des chromophores est aléatoire, l'anisotropie devient nulle aux temps longs, les multiples sauts, appelés migration de l'énergie, ont fait perdre la mémoire de l'orientation initiale des dipôles excités, conséquence de la photosélection. La vitesse de déclin de l'anisotropie dépend de la vitesse de transfert, et donc des distances et orientations respectives des différents donneurs et accepteurs (Gochanour & Fayer, 1981).

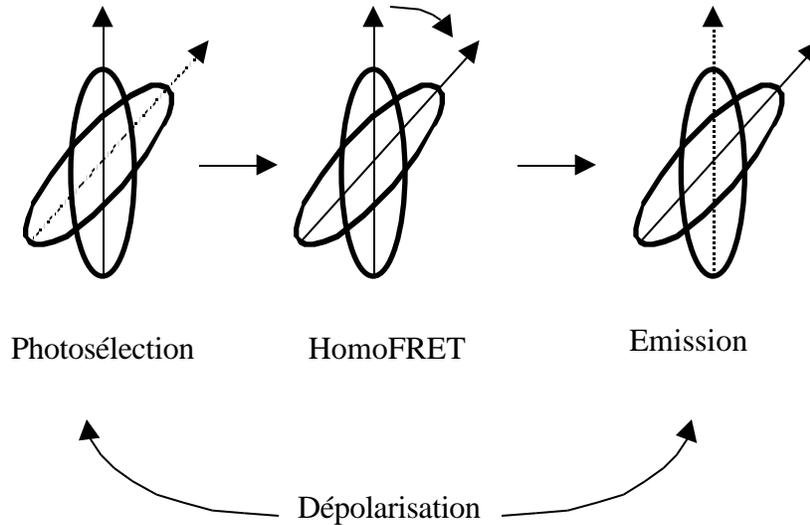


Figure II. 16 : Dépolarisation de la fluorescence par transfert d'énergie. En transférant son énergie à un dipôle dont l'orientation est différente, la fluorescence émise est désorientée par rapport à l'excitation. Pour une population de chromophores orientés par photosélection à l'excitation, les différents sauts d'énergie induisent une désorientation des dipôles et donc une dépolarisation de la fluorescence.

Dans le cas où les chromophores sont ordonnés, il peut demeurer une anisotropie résiduelle aux temps longs. Même après la migration de l'énergie entre les chromophores, l'état initial d'organisation des chromophores demeure (Baumann & Fayer, 1986). Chaque cas nécessite un

traitement théorique particulier avec des hypothèses sur l'organisation spatiale des chromophores étudiés.

Le modèle proposé ici consiste en un mécanisme de transfert d'énergie au sein d'une paire de chromophores. Ce cas plus simple a donné lieu à de multiples traitements théoriques (Bastiaens et al., 1992, Berberan-Santos & Valeur, 1991, Karolin et al., 1998, Tanaka & Mataga, 1979). Soit i et j la paire de chromophores, le transfert d'énergie a lieu entre le dipôle initialement excité i et le dipôle j et inversement entre j et i avec une même vitesse de transfert, k_{ij} . La rotation des molécules excitées et le transfert d'énergie entre i et j interviennent tous deux dans la dépolarisation de la fluorescence induite. En acceptant le fait que les fonctions de corrélation orientationnelle des molécules i et j , $r_i(t)$ et $r_j(t)$, i. e. l'anisotropie associée à la rotation de ces chromophores, et la probabilité que le fluorophore excité au temps t soit toujours le fluorophore initialement excité, $p(t)$, soient toutes des grandeurs indépendantes, l'anisotropie de fluorescence du système peut s'écrire

$$r(t) = 1/2[r_i(t) + r_j(t)]p(t) + 1/2[r_{ij}(t) + r_{ji}(t)][1 - p(t)] \quad (\text{II. 3. 19})$$

où $r_{ij}(t)$ représente la contribution dans l'anisotropie du transfert d'énergie entre la molécule i et la molécule j , réciproquement pour $r_{ji}(t)$. Ce formalisme a été introduit par Johansson et son équipe qui ont décrit la dépolarisation associée à un double-marquage sur une même protéine pour caractériser des distances intramoléculaires (Karolin et al., 1998). Dans le modèle présenté ici, qui s'applique à l'étude de la dimérisation d'une protéine fusionnée à la GFP, nous introduisons quelques simplifications :

- (i) les dimères sont tous identiques (configuration symétrique pour les deux chromophores) et leur orientation est aléatoire;
- (ii) la rotation du dimère complet dans le temps de la durée de vie est négligeable;
- (iii) il n'y a pas de réorientation des chromophores excités (modèle statique) dans le temps de la durée de vie, i. e. le chromophore de la GFP est immobile par rapport au dimère, l'angle entre les dipôles i et j est indépendant du temps.

Ainsi, on a :

- (i) les fonctions de corrélation orientationnelle qui dépendent de la distribution locale des

orientations des fluorophores i et j sont constantes, et

$$r_i(t) = r_j(t) = 1/5(3\cos^2 \theta_{ij} - 1) \quad (\text{II. 3. 20})$$

où θ_{ij} représente l'angle entre le moment de transition d'absorption et d'émission du fluorophore (Eq. II. 3. 11).

(ii) dans le modèle statique, $r_{ij}(t)$ et $r_{ji}(t)$ sont constants et dérivent de θ_{ij} and θ_{ji} , les orientations mutuelles entre le dipôle d'absorption du chromophore i et d'émission du chromophore j , et entre le dipôle d'absorption de j et d'émission de i , respectivement :

$$r_{ij}(t) = 1/5(3\cos^2 \theta_{ij} - 1) \quad (\text{II. 3. 21})$$

$$r_{ji}(t) = 1/5(3\cos^2 \theta_{ji} - 1) \quad (\text{II. 3. 22})$$

Pour une paire de chromophores identiques, la probabilité que le chromophore excité au temps t soit le chromophore initialement excité, $p(t)$, est décrite par :

$$p(t) = 1/2[1 + e^{-2t/\tau}] \quad (\text{II. 3. 23})$$

où τ est la vitesse de transfert.

En substituant les équations II. 3. 20, II. 3. 21, II. 3. 22 et II. 3. 23 dans II. 3. 19, on a

$$r(t) = 3/20 (2\cos^2 \theta_{ij} - \cos^2 \theta_{ij} - \cos^2 \theta_{ji}) e^{-2t/\tau} + 1/20 (6\cos^2 \theta_{ij} + 3\cos^2 \theta_{ij} + 3\cos^2 \theta_{ji} - 4) \quad (\text{II. 3. 24})$$

comme décrit par Tanaka et Mataga (Tanaka & Mataga, 1979).

Dans le cas du chromophore GFP, les moments de transitions d'absorption et d'émission sont parallèles (Volkmer et al., 2000). Ainsi, $\theta_{ij} = 0$, et $\theta_{ij} = \theta_{ji} = 0$. Le déclin d'anisotropie devient :

$$r(t) = 1/10[(3 - 3\cos^2 \theta_{ij}) e^{-2t/\tau} + 3\cos^2 \theta_{ij} + 1] \quad (\text{II. 3. 25})$$

Dans la limite du modèle statique (pas de réorientation des dipôle électroniques pendant la durée de vie de la fluorescence), la vitesse de transfert dépend de la distance, R , entre les deux chromophores par

$$\tau = (R_0/R)^6 \tau_0 \quad (\text{II. 3. 26})$$

comme décrit chapitre II. 2 (Eq. II. 2. 7). R_0 , la distance de Förster est décrite équation II. 2. 8. Ici

R_0 est calculé avec $\langle \cos^2 \theta \rangle$, le facteur d'orientation qui suivant les hypothèses du modèle est égal à

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = (\cos^2 \theta_{ij} - 3\cos^2 \theta_{ij})^2 \quad (\text{II. 3. 27})$$

où θ est l'angle que fait le vecteur R avec le dipôle électronique du chromophore.

II. 3. 5. Macromolécules déformables : effet de la dynamique torsionnelle de l'ADN sur l'anisotropie d'un intercalant

Comme présenté chapitre II. 3. 3, les mouvements locaux, d'origine brownienne, peuvent être impliqués dans la dépolarisation de la fluorescence. Aussi, une macromolécule déformable, comme l'ADN, est un lieu propice aux mouvements locaux. Dans le cas de la dynamique brownienne de l'ADN, on peut diviser les mouvements sommairement à trois niveaux : (i) mouvements globaux (rotation, reptation...), (ii) mouvements de courbure, (iii) mouvements de torsion le long de l'axe de la double hélice. C'est à ce troisième type de mouvement que l'on peut associer la dépolarisation de la fluorescence d'un intercalant fluorescent de l'ADN, comme par exemple l'éthidium. Les autres mouvements, courbure, reptation, rotation, s'effectuent à des échelles de temps bien plus grandes que le temps de vie d'un fluorophore ($\gg \tau$) et sont donc négligeables dans le traitement théorique de l'anisotropie de l'intercalant. La diffusion rotationnelle de l'éthidium, rigidement orienté lorsqu'il est intercalé par rapport à l'ADN, correspond aux mouvements de dynamique torsionnelle de l'ADN.

Les premiers travaux sur l'étude du déclin d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium intercalé remontent à 1970 (Wahl et al., 1970). Simultanément, Barkley et Zimm et l'équipe de Schurr ont modélisé cette situation en considérant l'ADN comme une série de petits bâtonnets rigides, connectés entre eux par des ressorts, chaque bâtonnet correspondant à une paire de bases (Allison & Schurr, 1979, Barkley & Zimm, 1979). La figure II. 17 schématise la modélisation de la double hélice.

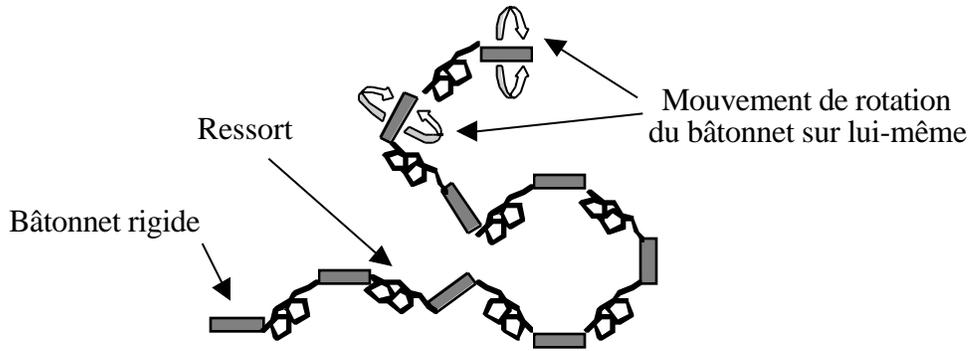


Figure II. 17 : Modélisation de l'ADN pour les mouvements de torsion suivant l'axe de la double hélice. L'ADN est modélisé de telle sorte que chaque paire de bases est représentée par un bâtonnet rigide. Les bâtonnets rigides sont connectés entre eux par un ressort. Aux mouvements de torsion de l'ADN correspondent les mouvements de rotation des bâtonnets sur eux-mêmes.

En simplifiant cette expression théorique, où l'oscillation rapide de la sonde dans son site d'intercalation, les mouvements de courbure et les mouvements globaux de l'ADN sont tous négligés, il est attendu une simulation de la dépolarisation de fluorescence de l'intercalant. C'est par propagation des petits mouvements de rotation de la paire de bases sur elle-même le long de la double hélice que le mouvement s'amplifie, jusqu'à avoir une incidence sur la polarisation de la fluorescence. Pour un ADN linéaire suffisamment long (de plus de mille paires de bases), que l'on peut considérer infini par rapport à la propagation de ces petits mouvements, il est présenté une simplification correspondant à la "Formule de la Zone Intermédiaire" pour le modèle (Thomas et al., 1980) (Fig. II. 18. A). Plus récemment, Schurr et son équipe ont adapté le modèle à la situation d'un ADN en interaction forte avec des protéines, ce modèle consistant en un filament fini rigidement fixé aux deux extrémités (Schurr, 1984, Schurr & Schurr, 1985). Dans ce cas, la propagation des petits mouvements ne s'effectue que le long de quelques paires de bases, avec pour conséquence une dépolarisation restreinte de la fluorescence de l'intercalant (Fig. II. 18. B).

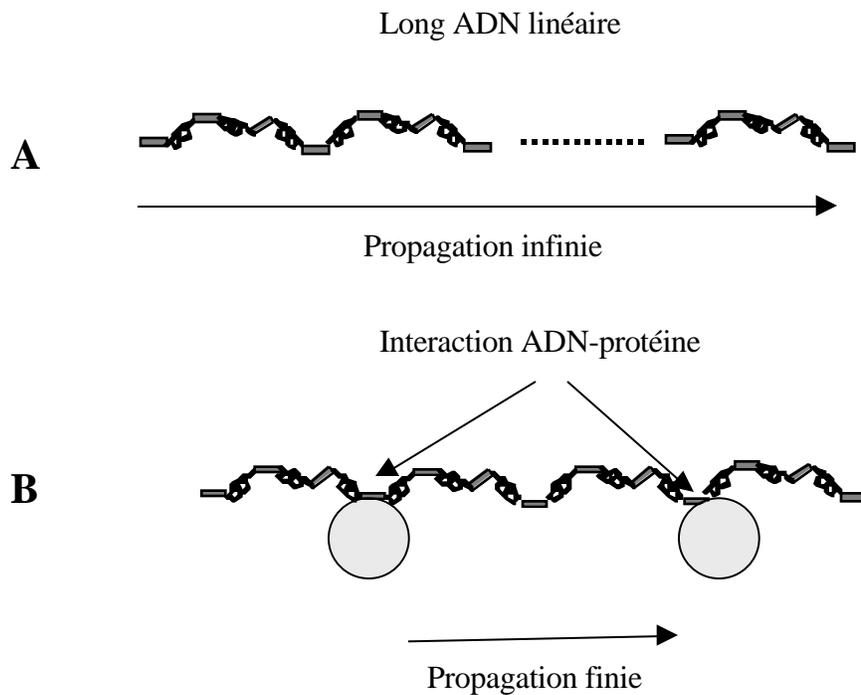


Figure II. 18 : Différents modèles de propagation des mouvements de torsion de l'ADN.

Ces deux modèles se présentent sous la forme de l'expression de l'anisotropie de fluorescence de l'éthidium rigidement intercalé à l'ADN par

$$r(t) = r_0 [(3/2 \cos^2 \theta_0 - 1/2)^2 + 3 \cos^2 \theta_0 \sin^2 \theta_0 C_1(t) + 3/4 \sin^4 \theta_0 C_2(t)] \quad (\text{II. 3. 28})$$

où $\theta_0 = 70.5^\circ$, l'angle entre le dipôle de transition de l'éthidium et l'axe de la double hélice de l'ADN (Schurr & Schurr, 1985), $C_1(t)$ et $C_2(t)$ sont les fonctions de corrélation $C_n(t)$, pour $n = 1$ et $n = 2$, qui modélisent la propagation des mouvements de torsion de l'ADN, et on a :

$$(i) \quad C_n(t) = \exp[-n^2 k_B T (t/\tau_n)^{1/2}] \quad (\text{II. 3. 29})$$

pour un long ADN linéaire, correspondant à une infinité de bâtonnets rigides (Formule de la Zone Intermédiaire), et

$$(ii) \quad C_n(t) = 1/N \prod_{m=1}^N \exp\{-n^2 \prod_{l=1}^N d_l^2 Q_{ml}^2 [1 - \exp(-t/\tau_l)]\} \quad (II. 3. 30)$$

pour un segment d'ADN fini rigidement fixé aux extrémités, avec

$$Q_{ml} = [2/(N + 1)]^{1/2} \sin [ml \pi / (N + 1)] \quad (II. 3. 31)$$

$$d_l^2 = (k_B T / \zeta)_+ \quad (II. 3. 32)$$

$$\tau_l = \zeta / \{4 \sin^2 [l \pi / 2(N + 1)]\} \quad (II. 3. 33)$$

où k_B est la constante de Boltzman et T la température. Le modèle d'anisotropie est donc caractérisé par trois paramètres distincts, ζ , τ , et N . En effet, les fonctions de corrélation de propagation des mouvements de torsion dépendent de ζ , la constante de torsion du ressort entre les bâtonnets, τ , le facteur de friction du bâtonnet dans son mouvement de rotation sur lui-même, proportionnel à la viscosité du milieu, et N le nombre de bâtonnets entre les deux extrémités fixées (uniquement pour le second modèle), soit le nombre de paires de bases impliquées dans le mouvement.

Chapitre III : Technique et technologies

Pour caractériser et mesurer les propriétés transitoires de la fluorescence, deux approches existent : (i) la technique du déclin de fluorescence (time domain), et (ii) la technique de phase et modulation (frequency domain). La figure III. 1, d'après Bastiaens et Squire (Bastiaens & Squire, 1999), présente schématiquement ces deux techniques.

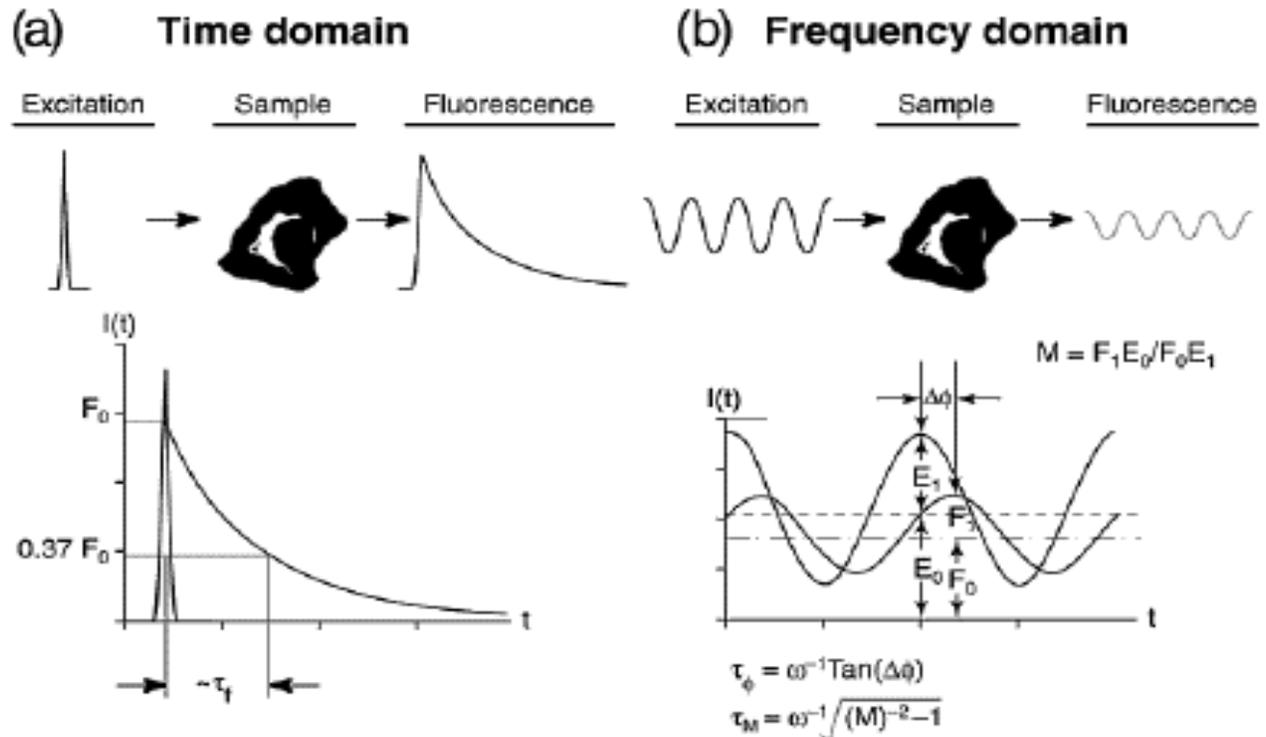


Figure III. 1 : Présentation des deux techniques de mesure des durées de vie de fluorescence (d'après Bastiaens et Squire, 1999).

Pour le déclin de fluorescence, l'excitation consiste en une brève impulsion lumineuse, et le déclin de la population des molécules excitées par cette impulsion, correspond à la mesure du déclin d'intensité de fluorescence de l'échantillon (voir Ch. II. 1. 5). On peut alors directement mesurer les différentes durées de vie de fluorescence de l'échantillon, en modélisant ce déclin par une somme de déclins exponentiels. Concernant la technique de phase et modulation, l'échantillon fluorescent est excité par une lumière d'intensité modulée. La fluorescence émise est aussi modulée à la même fréquence, par contre, il existe un déphasage et une démodulation caractéristique de la durée de vie

des molécules fluorescentes excitées. C'est l'étude de ce déphasage et de cette démodulation en fonction de la fréquence de modulation de la lumière excitatrice qui permet de modéliser l'échantillon fluorescent par différentes durées de vie. Qualitativement, pour une fréquence excitatrice bien plus rapide que la durée de vie de l'échantillon, la démodulation est maximum, l'échantillon ne voit pas les variations d'intensité d'excitation. Dans ce cas, si on peut le mesurer, le déphasage est quasi nul. Réciproquement, lorsque la fréquence d'excitation est plus lente que la durée de vie de l'échantillon, la démodulation est quasi nulle, et c'est le déphasage, caractéristique du temps moyen de résidence des molécules à l'état excité, qui est maximum.

Dans ce travail, mis à part une étude *in vitro* de l'intercalation de l'éthidium dans l'ARN de transfert (Ch. IV. 2. 2. 2), l'aspect transitoire de la fluorescence est abordée par la technique du déclin. Il est donc présenté dans ce chapitre la technique du comptage de photons uniques corrélé en temps, son adaptabilité aux différentes microscopies et les méthodes d'analyse des données expérimentales.

III. 1. Le comptage de photons uniques corrélé en temps

Pour mesurer le déclin de fluorescence, de par la brièveté de cette cinétique (quelques nanosecondes), les méthodes directes sont délicates. Même si la technologie des caméra CCD à obturateur très rapide se développe et que l'utilisation des "streak-camera" permettrait théoriquement de mesurer directement le déclin de fluorescence après une excitation très brève, la méthode de choix demeure la technique du comptage de photons uniques corrélé en temps (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) (O'Connor & Phillips, 1984).

III. 1. 1. Principe

Cette technique indirecte consiste à mesurer le temps de retard d'émission d'un photon unique par rapport à l'impulsion d'excitation. L'opération est alors répétée, de telle sorte que, dans les conditions où un seul photon de fluorescence est détecté à chaque impulsion, l'histogramme du

nombre de photons comptés en fonction du temps de retard correspond au déclin de fluorescence de l'échantillon (Fig. III. 2).

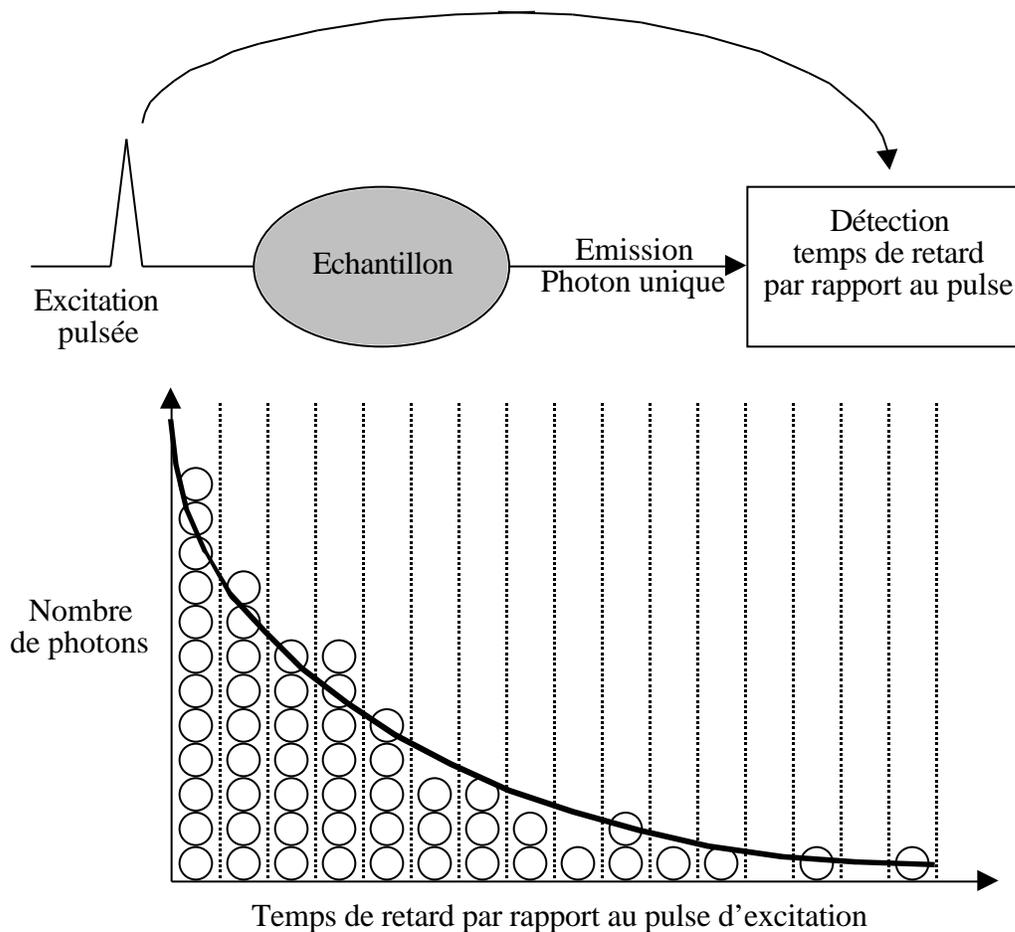


Figure III. 2 : Histogramme des retards des photons uniques comptés. L'histogramme de ces retards correspond alors au déclin de fluorescence.

Le temps nécessaire à l'acquisition du déclin correspond à quelques millions de photons. La statistique devient alors significative des propriétés transitoires de l'échantillon fluorescent. Le déclin correspond à la probabilité qu'une molécule excitée au temps 0 le soit encore au temps t . Il est essentiel que le taux de comptage (nombre de photons comptés par seconde) soit suffisamment faible pour que la probabilité que le système d'acquisition détecte deux photons pour une seule impulsion d'excitation soit quasi-nulle, donc négligeable. Dans le cas contraire, la détection ne mesurant que le premier photon défavoriserait le comptage des photons tardifs, l'histogramme serait distordu et la statistique deviendrait fautive.

III. 1. 2. L'excitation

Avant le développement des techniques laser à impulsion brève, l'excitation pulsée était générée par une lampe à arc délivrant des impulsions d'environ 1 ns. Par rapport à la durée de vie de fluorescence (de l'ordre de quelques ns), la durée de l'excitation n'était pas négligeable et le traitement théorique des données expérimentales était moins précis, principalement pour les durées de vie très courtes. Aujourd'hui, la résolution temporelle du comptage de photons uniques corrélé en temps est bien meilleure grâce à la technologie des laser à impulsion brève.

Le laser Titane:Saphir (Ti:Sa) est une source lumineuse naturellement pulsée. Selon la géométrie de la cavité et le mode de génération des impulsions, ce laser délivre des impulsions picosecondes (~ 1 ps) ou femtosecondes (~ 100 fs). Dans notre cas, le laser délivre des impulsions monochromatiques picosecondes avec une fréquence de répétition de 82 MHz. Il est constitué d'un cristal de Saphir dopé aux ions Titane, pompé soit par un laser à Argon ionisé, soit par un laser Nd:YVO₄ (neodymium yttrium vanadate) doublé en fréquence et lui-même pompé par diode. Le laser émet dans le proche infra-rouge (700 nm à 1 μ m). Pour une utilisation comme source d'excitation monophotonique des sondes fluorescentes classiquement utilisées en biologie, le faisceau laser est doublé en fréquence à l'aide d'un cristal doubleur LBO (Lithium tri borate) dont les propriétés nonlinéaires, par génération du second harmonique, permettent de délivrer une source lumineuse de longueur d'onde 350 à 500 nm. De même, pour les expériences de déclin de fluorescence, pour que les molécules se dés excitent complètement entre deux pulses laser, la fréquence de répétition du laser est divisée par 20 à l'aide d'un sélecteur d'impulsions. Ce sélecteur est constitué d'une cellule de Bragg comme modulateur acousto-optique et consiste à sélectionner une impulsion sur 20 en la diffractant d'un angle de 3° grâce à la propagation d'une onde acoustique à travers la cellule. Ainsi, après le sélecteur, la fréquence de répétition du laser est de 4 MHz. La source lumineuse est donc un laser délivrant des pulses picosecondes, à la fréquence de 4 MHz, de longueur d'onde monochromatique réglable entre 350 et 500 nm. La figure III. 3 présente en détail le laser Ti:Sa Tsunami (Spectra Physics) pompé par un Millennia (laser Nd:YVO₄, Spectra Physics) associé au module de sélecteur d'impulsion et de doubleur de fréquence.

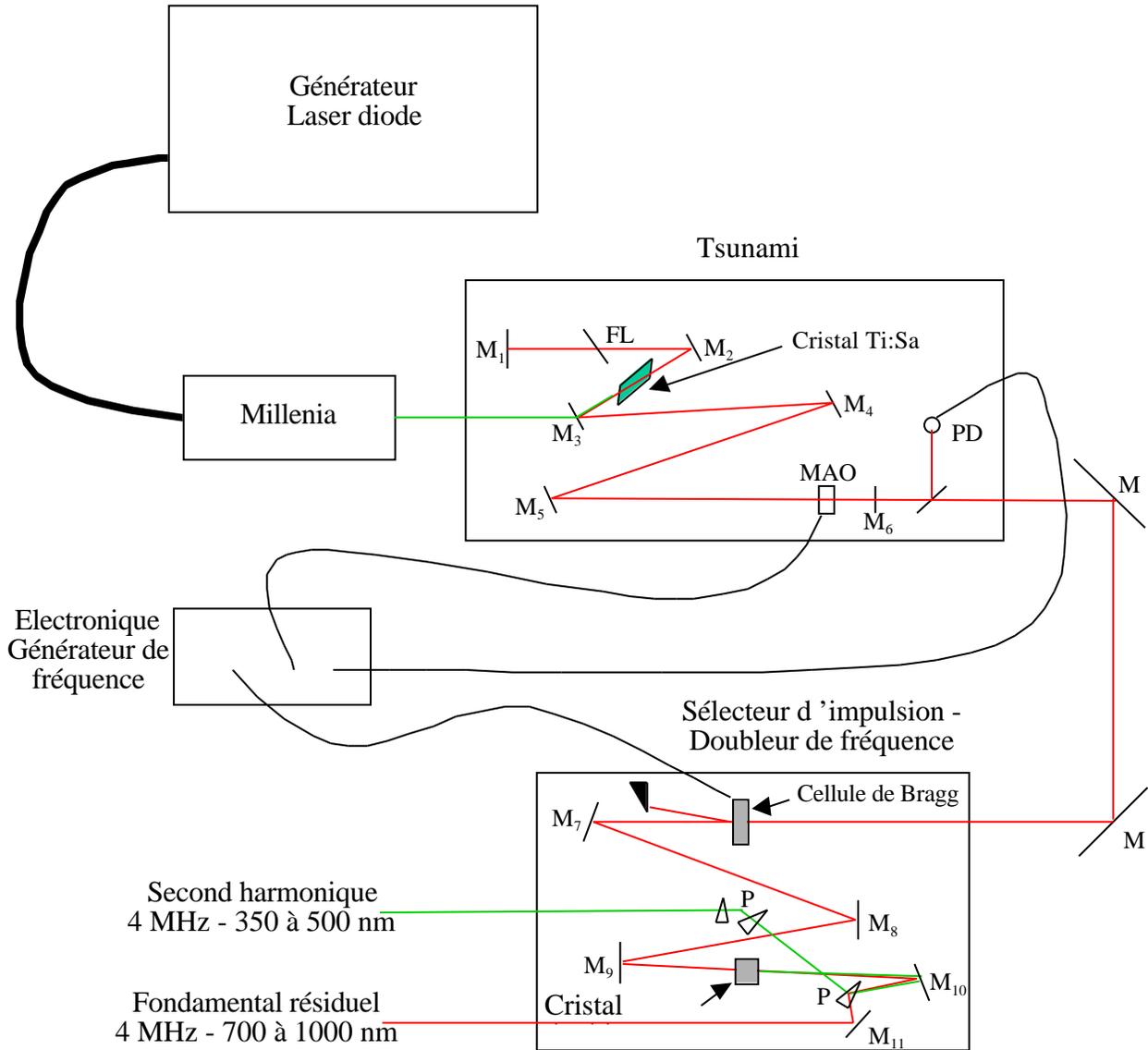


Figure III. 3 : Schéma du laser Ti:Sa, du sélecteur d'impulsion et du doubleur de fréquence.

M_i : miroirs dont M_1 miroir de fond de cavité associé à un interféromètre Gires-Tournois (GTI) qui contrôle la dispersion des pulses générés dans la cavité, M_6 miroir de sortie permettant à un faible pourcentage de lumière de sortir de la cavité laser et générant ainsi le faisceau laser en sortie de Tsunami ; FL : filtre de Liot sélectionnant la longueur d'onde dans la cavité ; MAO : modulateur acousto-optique générant le mode-locking ; PD : photodiode ultra rapide déclenchée par les pulses en sortie de Tsunami et contrôlant le MAO et la cellule de Bragg ; P : prismes. Les impulsions picosecondes sont générées par le laser Ti:Sa dont la dispersion est contrôlée par le GTI, la sélection en longueur d'onde se faisant par le FL et le mode-locking étant entretenu par le MAO, lui-même contrôlé par une PD en sortie de Tsunami. Les impulsions sont ensuite sélectionnées par une cellule de Bragg et doublées en fréquence par un cristal LBO pour générer des impulsions picosecondes à 4 MHz de fréquence de répétition à la longueur d'onde modulable de 350 à 500 nm (en réalité 380-495 nm, limite du doubleur de fréquence).

III. 1. 3. La détection

La détection de photons uniques s'effectue par un tube photo-multiplieur qui, pour un photon détecté génère une impulsion électronique. La corrélation temporelle du photon émis par rapport à l'impulsion laser peut être mesurée. La figure III. 4 représente un photo-multiplieur conventionnel.

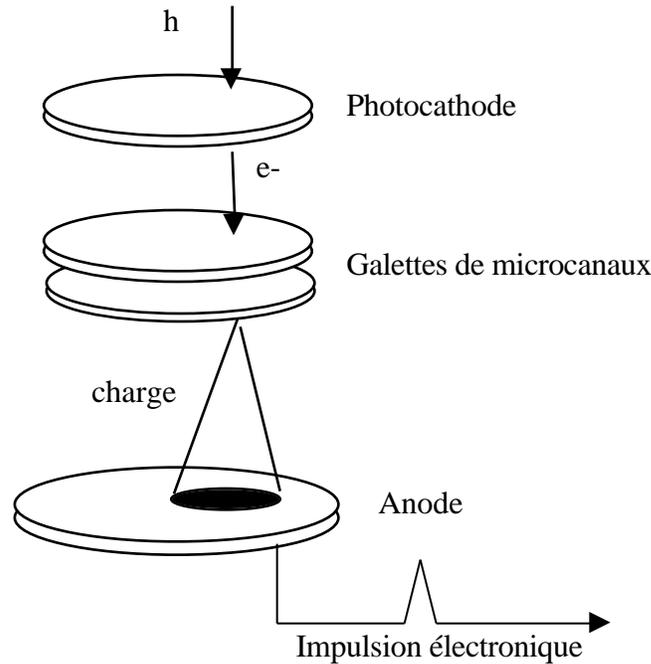


Figure III. 4 : Tube photo-multiplieur conventionnel.

Le principe est de transformer le photon incident en un électron par une photocathode. Le photon, par collision avec la surface de la photocathode, arrache une charge électronique. Cet électron est ensuite amplifié par deux gallettes de microcanaux. La différence de potentiel appliquée aux extrémités d'un micro-canal transporte l'électron incident à travers le canal. A chaque fois qu'il entre en collision avec la surface interne du canal, il arrache d'autres électrons jusqu'à former une avalanche d'électrons à la sortie du microcanal. L'avalanche d'électrons ainsi formée par les deux intensifications successives est recueillie par une anode. La charge associée devient une impulsion électronique. C'est cette impulsion électronique qui sera ensuite traitée par l'acquisition et corrélée à l'excitation (voir Chap. III. 1. 4).

De nouveaux types de détecteurs qui associent une corrélation spatiale à la corrélation temporelle ont vu le jour. Dans le cadre d'un projet européen, en collaboration étroite avec Klaus Kemnitz (Europhoton GmbH, Berlin), le laboratoire s'est doté de détecteurs TSCSPC (Time and Space Correlated Single Photon Counting). Ces détecteurs, de manufacture Russe (Eldy Ltd, St. Petersburg), sont des tubes photo-multiplieurs. L'anode de collection des électrons après leur amplification par les gallettes de microcanaux est soit remplacée par une ligne conductrice (détecteur Delay-line, DL), soit par quatre anodes individuelles réparties sur chaque quart de disque (détecteur quadrant-anode, QA) (Kemnitz et al., 1997, Kemnitz et al., 1995). Pour le DL, la position du photon incident est mesurée par la différence de temps que met l'impulsion électronique, générée par l'avalanche d'électrons, à parcourir les trajets entre le point d'impact et les deux extrémités de la ligne (Fig. III. 5).

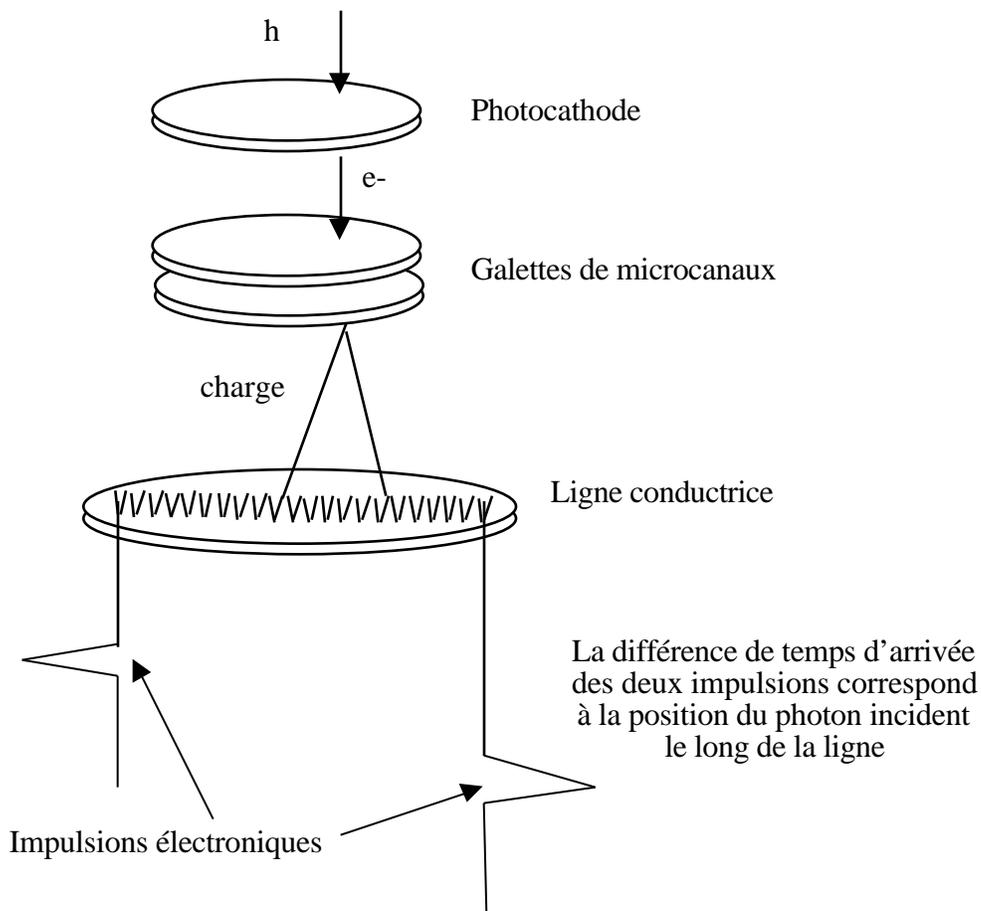


Figure III. 5 : Détecteur Delay-Line.

Pour le QA, la charge, en sortie des galettes de microcanaux, est récoltée par les quatre anodes. A chaque position du photon incident, la distribution de charges sur les anodes est différente. C'est donc la distribution de charges qui permet de déterminer la position du photon compté (Fig. III. 6).

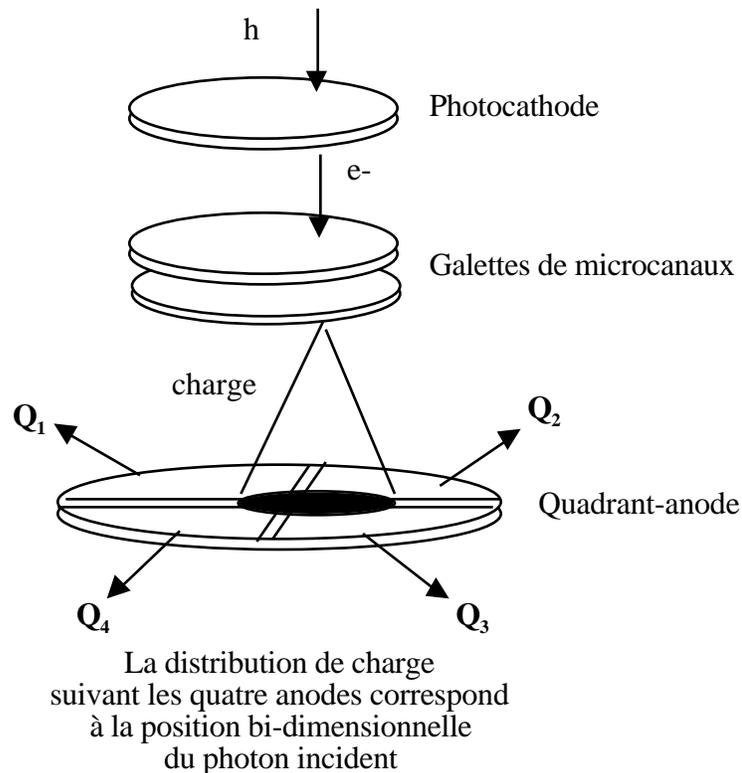


Figure III. 6 : Détecteur Quadrant-Anode.

Ainsi, pour le DL, l'information spatiale correspond à une dimension (position le long de la ligne), et pour le QA, l'information spatiale est bi-dimensionnelle. Le principe de la résolution spatiale bi-dimensionnelle du quadrant a récemment été utilisée pour un montage de pince optique (Meiners & Quake, 2000, Yamada et al., 2000). Dans ces applications, c'est une photodiode à quadrant qui est utilisée. La détection ne correspond pas dans ce cas à un photon unique, et il n'y a pas de corrélation temporelle avec une excitation pulsée.

L'utilisation d'un détecteur conventionnel en microscopie confocale a fait l'objet du développement d'un système par Robert Pansu et son équipe (Schouffeten et al., 1997). En collaboration avec son équipe, et parallèlement au projet du laboratoire de développer un système de

microscopie de durée de vie de fluorescence plein champ grâce aux détecteurs DL et QA, une partie de mon travail a consisté à utiliser ce système pour l'étude de la dynamique et des interactions de macromolécules en cellules vivantes. Concernant le DL, la première application a consisté, à l'aide d'un polychromateur linéaire, à utiliser la résolution spatiale comme résolution en longueur d'onde dans des expériences de déclin de fluorescence associés au spectre d'émission (Kemnitz et al., 1995). Des expériences préliminaires d'imagerie cellulaire, consistant à acquérir les déclin de fluorescence suivant une coupe de l'échantillon et correspondant à la surface active du DL, ont déjà été publiées (Kemnitz et al., 1997). C'est dans cet esprit qu'une partie de mon travail a consisté à développer une microscopie de durée de vie de fluorescence à l'aide du DL pour l'étude en cellules vivantes (Chap IV. 1. 1). Ultérieurement, les développements et mises au point présentés dans ce travail pourraient s'adapter au QA, avec l'avantage d'une acquisition bi-dimensionnelle des déclin.

III. 1. 4. L'acquisition

Le principe fondamental de l'acquisition des déclin consiste à corréler temporellement les photons uniques détectés par rapport à l'excitation laser. Pour ce faire, une photodiode ultra-rapide est utilisée comme détection de la référence temporelle de l'excitation. Le faisceau laser fondamental résiduel, après génération du second harmonique, est dirigé vers une photodiode qui transforme l'impulsion laser en une impulsion électronique. Les deux impulsions, l'une correspondant au signal du photo-multiplicateur, l'autre provenant de la photodiode, sont d'abord amplifiées puis discriminées par un discriminateur à fraction constante, avant d'être envoyées vers un convertisseur temps-amplitude ou TAC (Time-to-Amplitude Converter). Le signal du TAC, dont l'amplitude (entre 0 et 10 V) est linéaire par rapport à la différence de temps d'arrivée des deux impulsions est finalement traité par une carte d'acquisition informatique qui convertit numériquement l'information analogique. Le programme informatique n'a plus qu'à générer l'histogramme présenté figure III. 2 en accumulant les événements uniques jusqu'à présenter une statistique qui correspond au déclin de fluorescence. Un schéma de fonctionnement de ce traitement électronique est présenté figure III. 7.

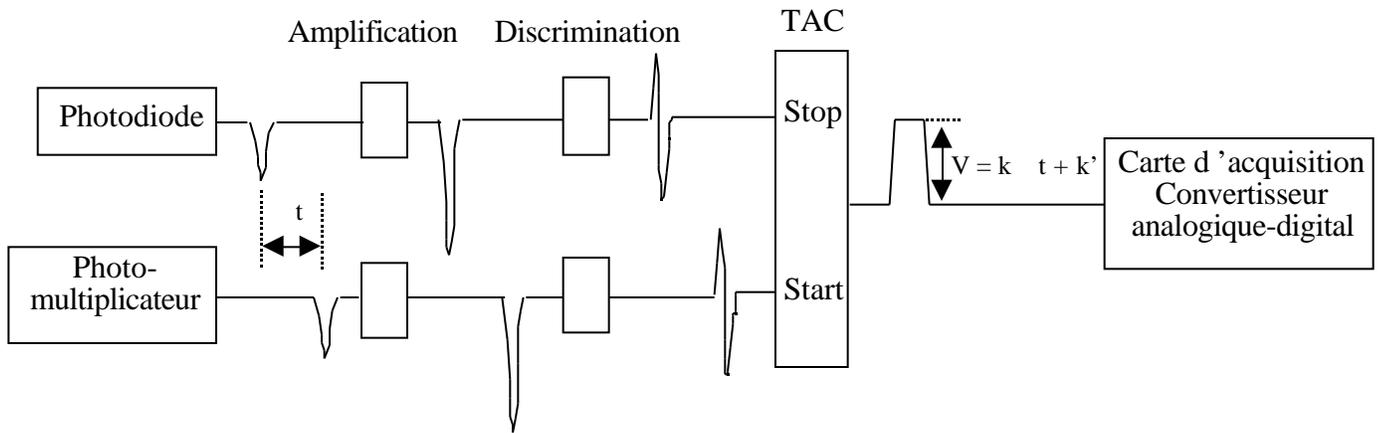


Figure III. 7 : Schéma de fonctionnement de l'électronique mesurant le retard des photons comptés par rapport au pulse laser.

Pour le DL, en plus de la corrélation temporelle, la corrélation spatiale s'effectue de la même manière par un second TAC, sachant que la position du photon incident par rapport à la ligne correspond à la différence de trajet de la charge d'électrons aux deux extrémités de la ligne conductrice. On peut considérer deux montages différents :

(i) le schéma indépendant : dans ce cas les deux TAC mesurent indépendamment la corrélation spatiale et temporelle du photon incident. Une impulsion électronique provenant de la seconde galette de micro-canaux est utilisée pour la corrélation temporelle, les deux signaux provenant de la ligne étant traités pour la corrélation spatiale (Fig. III. 8).

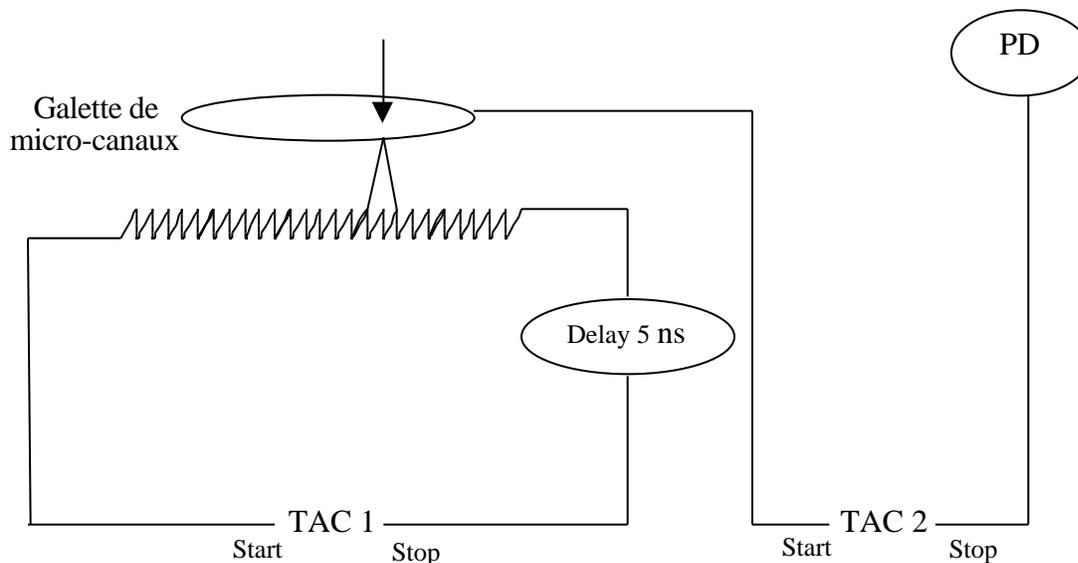


Figure III. 8 : Fonctionnement du schéma indépendant pour le détecteur DL. Dans ce fonctionnement, chaque TAC mesure indépendamment le retard et la position du photon incident.

(ii) le schéma asymétrique : le TAC mesurant la corrélation temporelle utilise une des impulsions électroniques provenant de la ligne (Fig. III. 9).

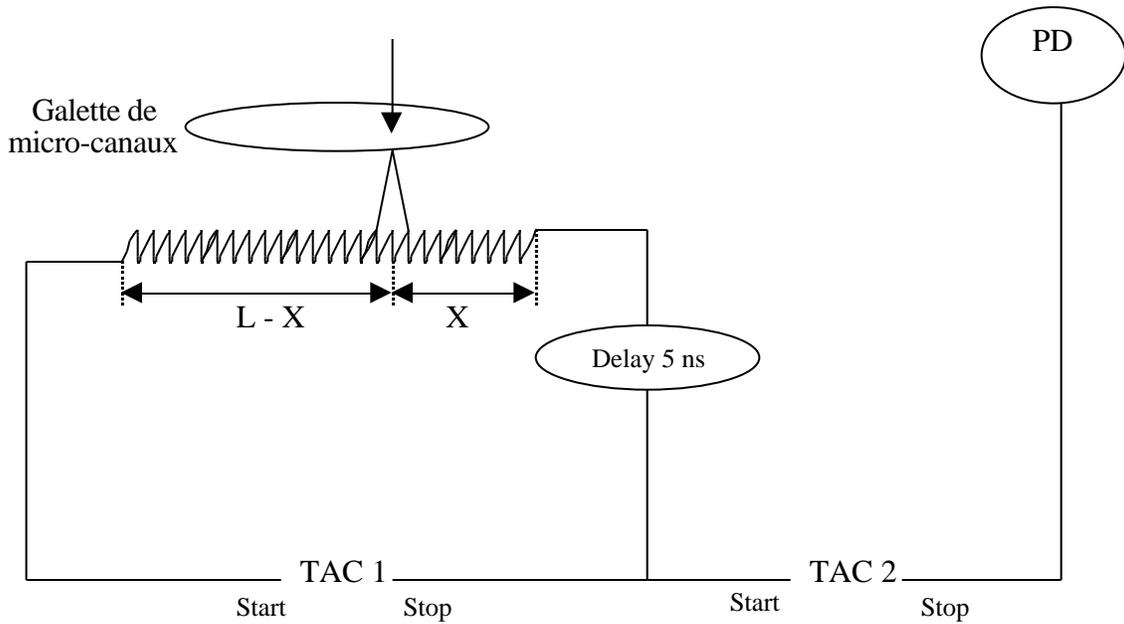


Figure III. 9 : Fonctionnement du schéma asymétrique pour le détecteur DL.

Dans ce fonctionnement, les deux mesures de TAC sont dépendantes. Cette dépendance permet néanmoins de calculer le retard et la position du photon incident (voir texte).

Dans ce cas, le temps mesuré par ce TAC dépend de la position du photon incident. On a :

$$t(\text{TAC1}) = f(X) = L/V - 5 - 2X/V \quad (\text{III. 1. 1})$$

$$t(\text{TAC2}) = f(X, t) = 5 + t + X/V \quad (\text{III. 1. 2})$$

où L et X sont présentés figure III. 9, V est la vitesse de conduction de l'impulsion électronique et t le temps de retard d'émission du photon par rapport à l'excitation. En combinant ces deux équations, on trouve :

$$t(\text{TAC1}) + 2 t(\text{TAC2}) - (L/V + 5) = 2 t \quad (\text{III. 1. 3})$$

Ainsi, il est possible de mesurer X et t.

Pour les deux schémas, la carte d'acquisition consiste en un double convertisseur analogique-digital. Dans le cas du schéma asymétrique, l'acquisition prend en compte la correction présentée équation III. 1. 3. Dans les deux cas, l'histogramme généré par le logiciel d'acquisition est bi-

dimensionnel (Fig. III. 10) avec, pour chaque photon compté, un échantillonnage sur 256 canaux pour la corrélation spatiale et de 1024 canaux pour la corrélation temporelle.

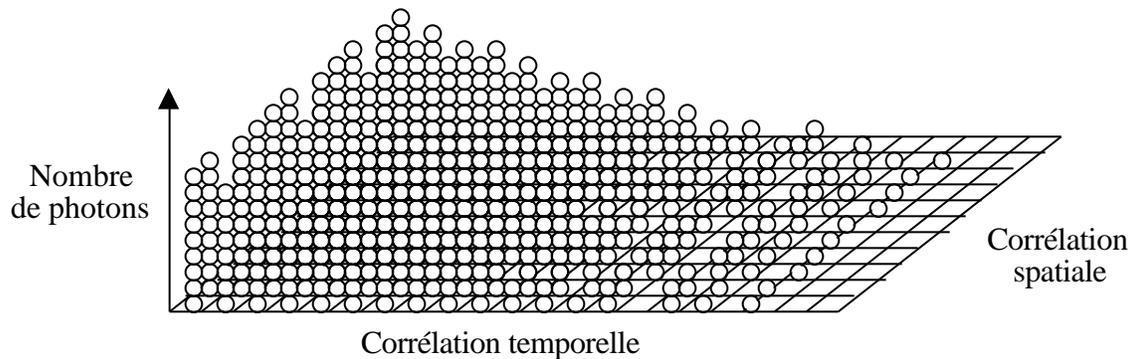


Figure III. 10 : Histogramme 2D du retard et de la position des photons comptés. Chaque photon a deux coordonnées (retard et position), l'acquisition génère alors un histogramme à deux dimensions. On peut extraire de cet histogramme les déclins de fluorescence provenant de différentes positions.

Concernant le fonctionnement de l'acquisition du QA, les charges associées aux quatre anodes indépendantes sont quantifiées puis numérisées indépendamment de la corrélation spatiale mesurée grâce à un signal provenant de l'intensificateur d'électrons, comme présenté dans le schéma indépendant du DL. De plus, il est déterminé le temps absolu de l'arrivée du photon par l'horloge interne de l'ordinateur. Ainsi, à chaque photon compté correspond six coordonnées : t , Q_1 , Q_2 , Q_3 , Q_4 et la date. Les informations Q_i sont traitées pour finalement caractériser à chaque photon compté sa position (x, y) , t et la date. Ce détecteur devrait s'avérer très performant pour associer l'approche des déclins de fluorescence (t) à une imagerie (x, y) résolue en temps (date).

III. 2. Descriptif des montages

Le principe du microscope à épifluorescence inversé confère au système une géométrie adéquate pour visualiser la fluorescence provenant de cellules en culture sur lamelle. En cellule vivante, lorsque l'intensité d'excitation n'est pas maîtrisée, cela entraîne le photoblanchiment des sondes et la production de radicaux libres en cellules par réaction photodynamique (Delic et al., 1991). Pour prévenir cette perturbation, une issue est de réduire sensiblement le niveau d'excitation.

La sensibilité inhérente à la technique de comptage de photon unique corrélé en temps permet d'opérer à de très faibles intensités d'excitation. Cette technique s'avère donc un outil de choix pour des études en cellules vivantes.

III. 2. 1. Détection confocale

Le principe consiste à focaliser l'excitation et à sélectionner à l'émission un volume focal à l'aide d'un diaphragme ou pinhole (Fig. III. 11). Ici, l'entrée d'une fibre optique fait office de pinhole.

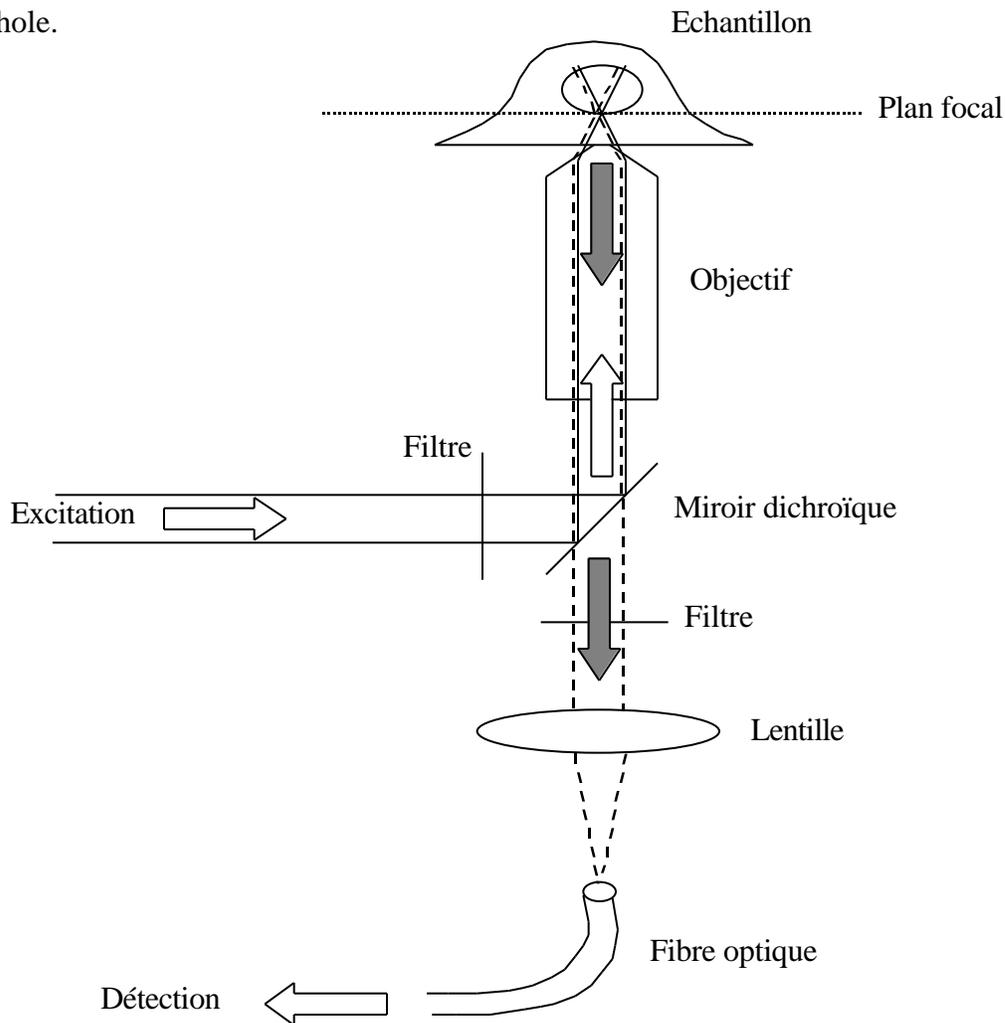


Figure III. 11 : Chemin optique du montage confocal.

Au diamètre du pinhole correspond la sélection du volume focal, ce qui permet de diminuer sensiblement la profondeur de champ. En imagerie confocale, le plan (x, y) est balayé pour

reconstituer une image point par point. Dans le cas d'une acquisition corrélée en temps, l'adaptation au balayage est délicate à cause de la nécessité d'accumuler les photons uniques comptés pendant un certain temps. Dans ce travail, il est présenté un système confocal sans balayage.

Le montage confocal installé au laboratoire de Robert Pansu a été caractérisé en détail (Schouffet et al., 1997). Il est présenté figure III. 12.

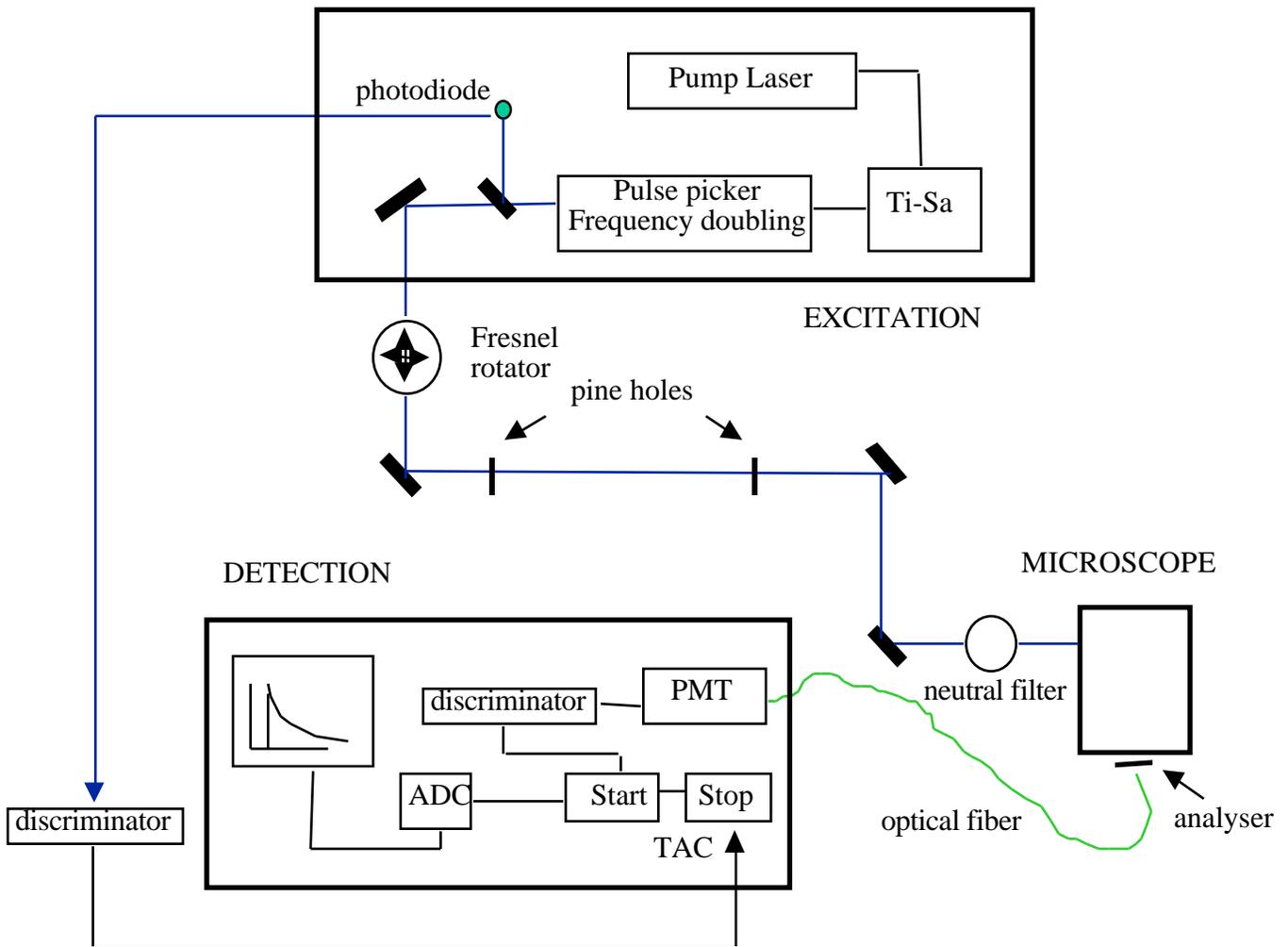


Figure III. 12 : Schéma général du montage confocal (Laboratoire PPSM, ENS Cachan).

Brièvement, l'excitation consiste en un laser Ti:Sa Tsunami pompé par un laser Argon (Spectra Physics) délivrant des impulsions picoseconde à 495 nm avec une fréquence de répétition de 4 MHz. Le faisceau laser est directement dirigé vers l'entrée d'un microscope à épifluorescence inversé Nikon et focalisé à l'aide d'un objectif x 100 (ON = 0,8 – 1,3) à immersion. La localisation

subcellulaire de l'excitation est contrôlée soit par l'observation de la diffraction du spot laser simultanément avec l'image de la cellule en transmission, soit par l'observation de l'image de la cellule en fluorescence par une illumination plein champ conjointement avec un repère fixe aux oculaires. Il est alors possible de choisir la localisation subcellulaire du volume focal d'observation. Les photons de fluorescence provenant de ce volume sont collectés par l'objectif et conduits à travers une fibre optique vers le détecteur. C'est le diamètre de la fibre qui joue le rôle de pinhole. Le volume focal correspond à $1 \mu\text{m}^3$. La diffusion provenant de l'excitation est coupée par un filtre placé devant l'entrée du détecteur. Le détecteur est un tube photomultiplicateur (Hamamatsu R3809U) sans résolution spatiale. Le système d'acquisition (Chap. III. 1. 4) est numérisé sur 2048 canaux. Pour les études de polarisation, un rotateur de Fresnel est placé à l'excitation pour faire tourner la direction de polarisation du laser naturellement polarisé. Pour la sélection à l'émission, un polariseur est placé avant la fibre optique.

III. 2. 2. Détection par le détecteur Delay-line

Cette fois, l'excitation est homogène dans tout le champ d'observation accessible au travers de l'objectif. En utilisant un objectif à immersion à grande ouverture numérique ($ON = 1,3$), on diminue la profondeur de champ (en z) et on augmente la résolution en x et en y . La résolution spatiale est moins bonne que pour un système confocal mais s'avère suffisante à l'observation de structures subcellulaires telles que mitochondries ou lysosomes. Pour un système de microscopie de déclins de fluorescence utilisant le DL ou le QA, la microscopie plein champ a l'avantage d'exciter de manière homogène tout l'échantillon. Il est alors possible de combiner la corrélation temporelle qui nécessite une acquisition relativement longue à une imagerie de fluorescence conventionnelle.

La caractérisation du montage utilisant le DL est présentée chapitre IV. 1. 1. L'assemblage de ce système est présenté figure III. 13.

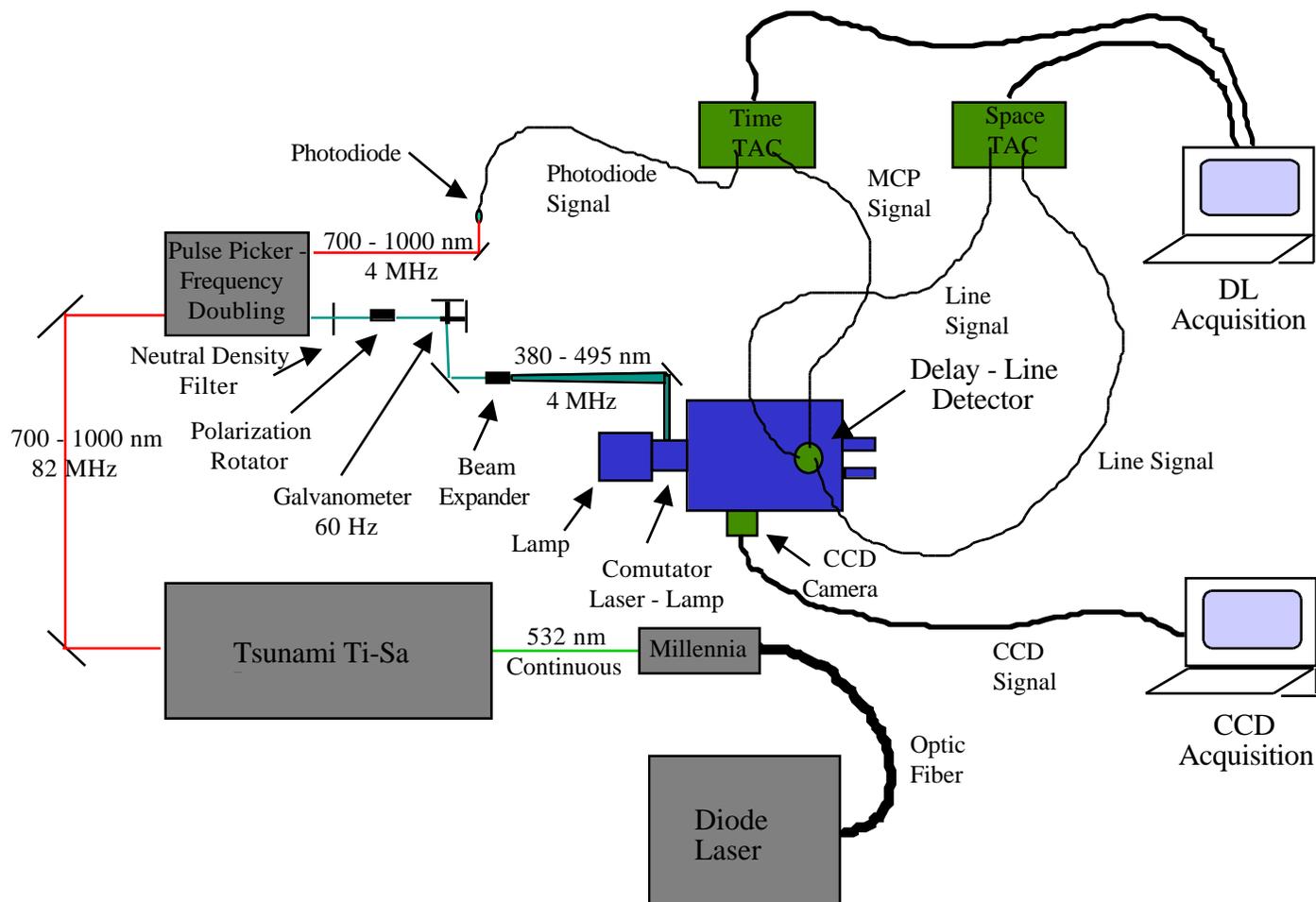


Figure III. 13 : Schéma général du montage DL.

L'excitation consiste en un laser Ti:Sa Tsunami pompé par un Millenia V associé à un sélectionneur d'impulsion et un doubleur de fréquence (Spectra Physics) délivrant des impulsions avec une fréquence de répétition de 4 MHz et sélectionnable en longueur d'onde entre 380 et 495 nm. Pour obtenir une illumination "plein champ" avec le laser, deux lentilles (une convergente et une divergente) sont positionnées sur le trajet optique du laser pour élargir le faisceau. A cause de la cohérence du rayonnement laser, des franges d'interférences sont produites au niveau du plan focal de l'objet. L'élimination de ces franges a été réalisée grâce à un galvanomètre (ERROL, France). Ce montage optique permet d'obtenir au plan focal de l'objet une illumination homogène (voir Chap. IV. 1. 1). Un commutateur constitué d'un miroir pivotant permet de sélectionner à l'entrée du microscope l'illumination laser ou une illumination conventionnelle par une lampe à vapeur de mercure 50 W. Le microscope à épifluorescence inversé (Leica DMIRBE) est généralement utilisé avec un objectif ultrafluor x 100 (ON = 0,8 – 1,3) à immersion. L'image de fluorescence est alors

envoyée sélectivement vers deux sorties : (i) sur la face d'une caméra CCD refroidie à balayage lent de 1024 x 1024 pixels numérisés sur 4096 niveaux de gris (SILAR, Russie) ou (ii) sur l'entrée d'un détecteur DL (Eldy Ltd, Russie). L'acquisition CCD permet une imagerie conventionnelle des cellules pour visualiser la fluorescence du donneur et de l'accepteur dans des expériences de FRET ou pour contrôler l'état cellulaire. Elle est aussi utilisée pour sélectionner la partie de l'image de fluorescence vu par le DL correspondant à une surface de 50 μm sur 8 μm au niveau de l'échantillon (l'épaisseur de la ligne du DL n'est pas négligeable) avec l'objectif x100 (et optovar x 1,6). La corrélation temporelle des photons comptés par le détecteur DL est réalisée par rapport au signal d'une photodiode ultra-rapide (bande passante 1,5 GHz ; Hamamatsu) illuminée par l'émission fondamentale résiduelle du laser Ti:Sa lors du doublage de fréquence (voir Chap. III. 1). La configuration d'acquisition présentée figure III. 13 correspond à un schéma indépendant (Chap. III. 1. 4).

III. 3. Analyse des données

Les données expérimentales, sous forme d'histogrammes, correspondent aux déclin de fluorescence. L'analyse consiste à ajuster ces déclin à des fonctions correspondant à des modèles théoriques (voir Chap. II). Pour l'analyse des durées de vie, les déclin sont analysés sous la forme d'une somme de déclin exponentiels, la vitesse de chaque déclin correspondant à une durée de vie et le coefficient pré-exponentiel correspondant à la proportion de chaque espèce. On a

$$i(t) = \sum a_i \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{III. 3. 1})$$

où a_i et τ_i sont le coefficient pré-exponentiel et la durée de vie de l'espèce i , respectivement.

Pour analyser l'anisotropie de fluorescence, chaque déclin, parallèle et perpendiculaire, est modélisé conjointement suivant les équations II. 3. 13 et II. 3. 14, permettant de retrouver le déclin de fluorescence et la fonction d'anisotropie associée. A titre d'exemple, pour la diffusion rotationnelle d'une espèce monoexponentielle modélisée par une sphère, on a

$$i_{\parallel}(t) = a/3 \exp(-t/\tau) [1 + 2 r_0 \exp(-t/\tau)] \quad (\text{III. 3. 2})$$

et

$$i(t) = a/3 \exp(-t/\tau) [1 - r_0 \exp(-t/\tau_0)] \quad (\text{III. 3. 3})$$

où a , τ , r_0 et τ_0 sont le coefficient pré-exponentiel, la durée de vie, l'anisotropie initiale et le temps de corrélation rotationnelle du fluorophore, respectivement.

III. 3. 1. Algorithme d'ajustement par la méthode des moindres carrés

Pour corriger les effets de l'acquisition sur les déclinés de fluorescence mesurés, une déconvolution par la réponse temporelle de l'instrument est nécessaire. Cela consiste préalablement à mesurer la réponse de l'instrument à la diffraction de l'excitation laser (IRF, Instrument Response Function). L'impulsion picoseconde du laser d'excitation peut être considérée comme une source infiniment courte. En d'autres termes, elle correspond à une distribution de Dirac au temps 0 pour l'échantillonnage de l'intervalle de temps considéré dans les expériences de déclin. De fait, à l'image de cette distribution de Dirac par l'instrument correspond une distribution temporelle dont la largeur à mi-hauteur (FWHM, Full Width Half Maximum) est de l'ordre de 100 ps. Déconvoluer les données expérimentales, c'est tenir compte de cette transformation dans l'analyse des déclinés. A la déconvolution des données expérimentales correspond la convolution par l'IRF des déclinés théoriques (Fig. III. 14).

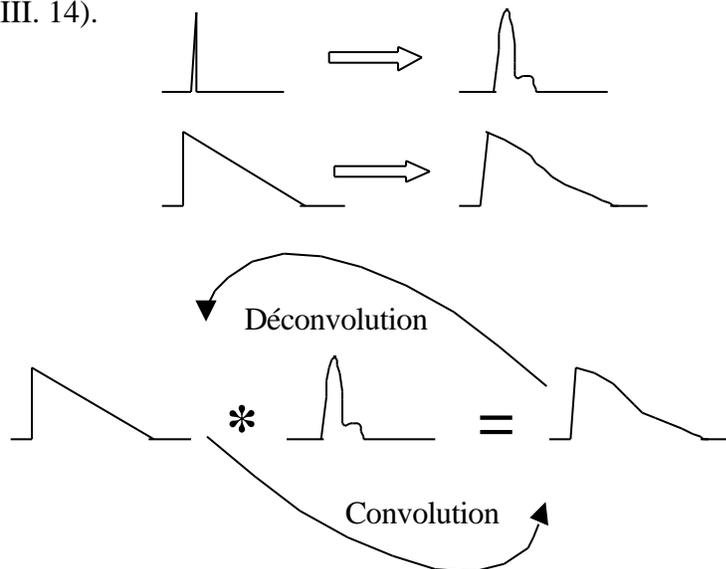


Figure III. 14 : Transformation des déclinés théoriques par le système d'acquisition.

A la réponse de l'instrument à une impulsion brève (pic de Dirac) correspond une image dont la distribution temporelle est non nulle (IRF, Instrument Response Function). Une même distorsion existe pour les déclinés. A la convolution du déclin théorique par cette IRF correspond le déclin expérimental. La transformation inverse est la déconvolution.

Ainsi, dans l'algorithmique d'ajustement, la comparaison des déclinés expérimentaux s'effectue avec le produit de convolution du modèle théorique par l'IRF. Contrairement à la déconvolution, cette convolution se calcule directement sans avoir à passer par l'espace de Fourier. Les équations III. 3. 1, III. 3. 2 et III. 3. 3 s'écrivent alors

$$i(t) = \text{IRF}(t) * a_i \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{III. 3. 4})$$

$$i_{//}(t) = \text{IRF}(t) * a/3 \exp(-t/\tau) [1 + 2 r_0 \exp(-t/\tau)] \quad (\text{III. 3. 5})$$

$$i(t) = \text{IRF}(t) * a/3 \exp(-t/\tau) [1 - r_0 \exp(-t/\tau)] \quad (\text{III. 3. 6})$$

Utilisant l'algorithme non-linéaire des moindres carrés de Marquardt, le Laboratory for Fluorescence Dynamics (LFD, Université de l'Illinois) a développé un logiciel d'ajustement des déclinés d'intensité et d'anisotropie de fluorescence mesurés expérimentalement (Beechem et al., 1991). Ce logiciel (Globals unlimited) permet de déterminer les paramètres d'un modèle qui minimise la fonction χ^2 , avec

$$\chi^2 = \left[\sum_{l=1}^N (\text{expérience}_l - \text{modèle}_l)^2 / \sigma_l^2 \right] / (N - m - 1) \quad (\text{III. 3. 7})$$

où N est le nombre de données (ici, le nombre de canaux temporels dans l'histogramme), σ_l est la déviation standard de la donnée l, et m le nombre de paramètres du modèle. Les valeurs du modèle (modèle_l) sont déterminées après convolution avec l'IRF et proviennent d'équations du type des équations III. 3. 4, III. 3. 5 et III. 3. 6. Le choix et la pertinence des modèles s'effectuent par comparaison de la valeur du χ^2 pour chaque modèle.

III. 3. 2. Analyse globale pour le DL

En plus d'analyser séparément les déclinés de fluorescence, l'intérêt du logiciel "Globals unlimited" est de pouvoir effectuer des analyses dites globales (Beechem et al., 1991). Cela consiste à analyser simultanément plusieurs déclinés en liant certains paramètres d'ajustement. Par exemple, si chaque déclin correspond à une longueur d'onde d'émission de la même solution, en liant les durées de vie (indépendantes de la longueur d'onde d'émission), l'analyse globale des déclinés permet de retrouver les différents facteurs pré-exponentiels de chaque déclin caractéristique du

spectre d'émission de chaque durée de vie. Cette approche s'avère très performante, profitant d'une meilleure statistique puisque les déclinés ne sont pas analysés séparément.

Pour le DL, les données peuvent être analysées de la même manière, en construisant des déclinés de fluorescence pour différentes positions le long de la ligne. En supposant que les durées de vie détectées sont indépendantes spatialement, et en les liant dans l'analyse globale des différents déclinés, le résultat de ces ajustements se trouve sous la forme d'une distribution spatiale de concentration relative des différentes espèces caractérisées par leur durée de vie (Fig. III. 15).

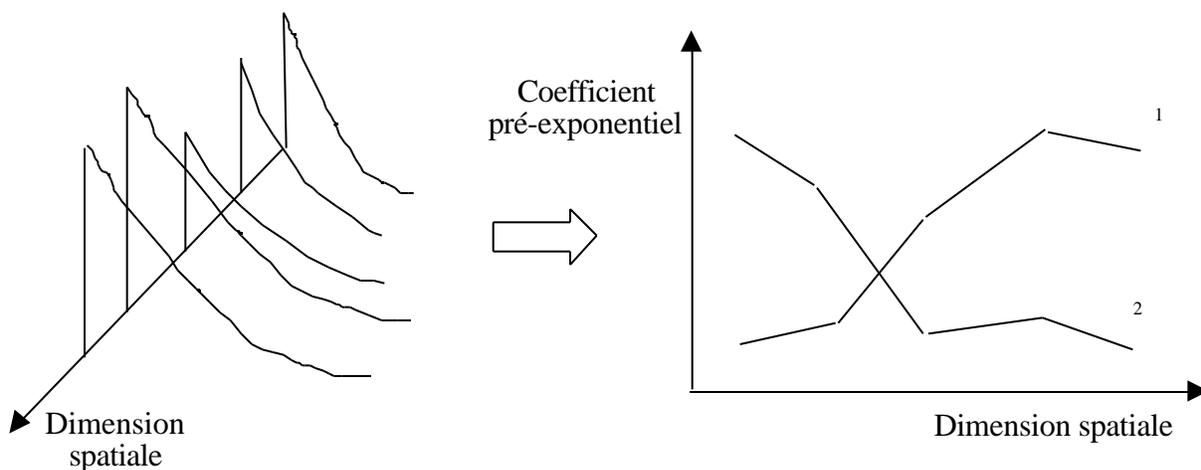


Figure III. 15 : Analyse globale des déclinés en fonction de leur position le long du DL. Les résultats sont présentés sous la forme de contributions de différentes durées de vie identiques pour tous les déclinés analysés. Ces contributions présentent des variations en fonction de la position spatiale le long du DL.

Par exemple, dans le cas de la GFP, majoritairement mono-exponentielle, en présence de FRET avec un accepteur (par exemple la DsRed), il y aurait apparition d'une seconde durée de vie. La distribution spatiale des concentrations relatives de ces deux espèces pourrait correspondre à la distribution de concentration relative de la protéine fusionnée à la GFP en interaction ou non avec son partenaire fusionné à la Dsred, et ce selon la localisation cellulaire le long du DL.

Chapitre IV : Mise au point, développements et caractérisation des sondes fluorescentes en cellules vivantes

Avant de présenter les résultats biologiques démontrant les capacités de la microscopie des déclins de fluorescence pour l'étude de la dynamique et des interactions macromoléculaires en cellule vivante, ce chapitre traite de la caractérisation du système DL et de la mise au point des déclins d'anisotropie de fluorescence sous microscope. Sont présentés ensuite les résultats concernant les cinétiques de fluorescence de la GFP et de ses variants spectraux (XFP) seule ou fusionnée à une protéine d'intérêt, la détermination des distances de Förster (R_0) des couples de XFP utilisés pour les études de FRET et la caractérisation de l'anisotropie de fluorescence de la GFP. Enfin, sont analysées les propriétés de fluorescence de l'éthidium, molécule s'intercalant dans l'ADN et constituant un marqueur de la chromatine. Tous ces résultats préliminaires s'avèrent essentiels à l'analyse et à l'exploitation des résultats biologiques présentés chapitre V.

IV. 1. Développements technologiques

Les développements technologiques présentés ici concernent tout le travail effectué pour améliorer la performance des différents systèmes de déclin de fluorescence utilisés. L'adaptation de ces systèmes à la microscopie et à l'étude de la cellule vivante a demandé des développements techniques particuliers, et la caractérisation des mesures d'anisotropie de fluorescence résolues en temps.

IV. 1. 1. Caractérisation du système DL

Le comptage de photon unique corrélé en temps et en espace adapté à la microscopie de fluorescence est une technique en émergence. Le développement, la validation et l'optimisation du montage DL présenté chapitre III. 2. 2 ont été nécessaires à son utilisation pour la biologie cellulaire.

IV. 1. 1. 1. Illumination laser plein champ

Le concept expérimental de l'illumination laser plein champ consiste à mimer l'illumination avec la lampe à vapeur de mercure à l'entrée du microscope. En collaboration avec Christian Hubert (ERROL), notre choix s'est porté sur l'expansion du faisceau laser d'origine à l'aide de deux lentilles. Le résultat à l'entrée du microscope correspond à un faisceau très légèrement divergent et remplissant la totalité du diaphragme de champ lorsqu'il est ouvert (Fig. IV. 1).

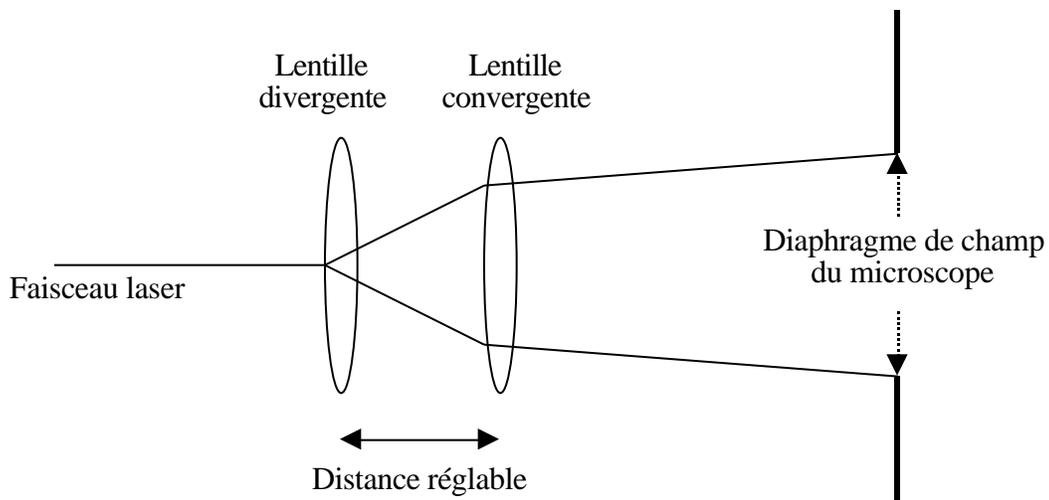


Figure IV. 1 : Expansion du faisceau laser à l'entrée du microscope.

Le laser est une source cohérente. Lors de son passage, les optiques du microscope génèrent des franges d'interférence. Pour moyenniser ces franges d'interférence et obtenir une illumination homogène sur tout le champ, un galvanomètre utilisé à une fréquence de 60 Hz a été placé avant les lentilles de telle sorte que le faisceau laser focalisé oscille de quelques millimètres à l'entrée de l'expandeur (Fig. IV. 2).

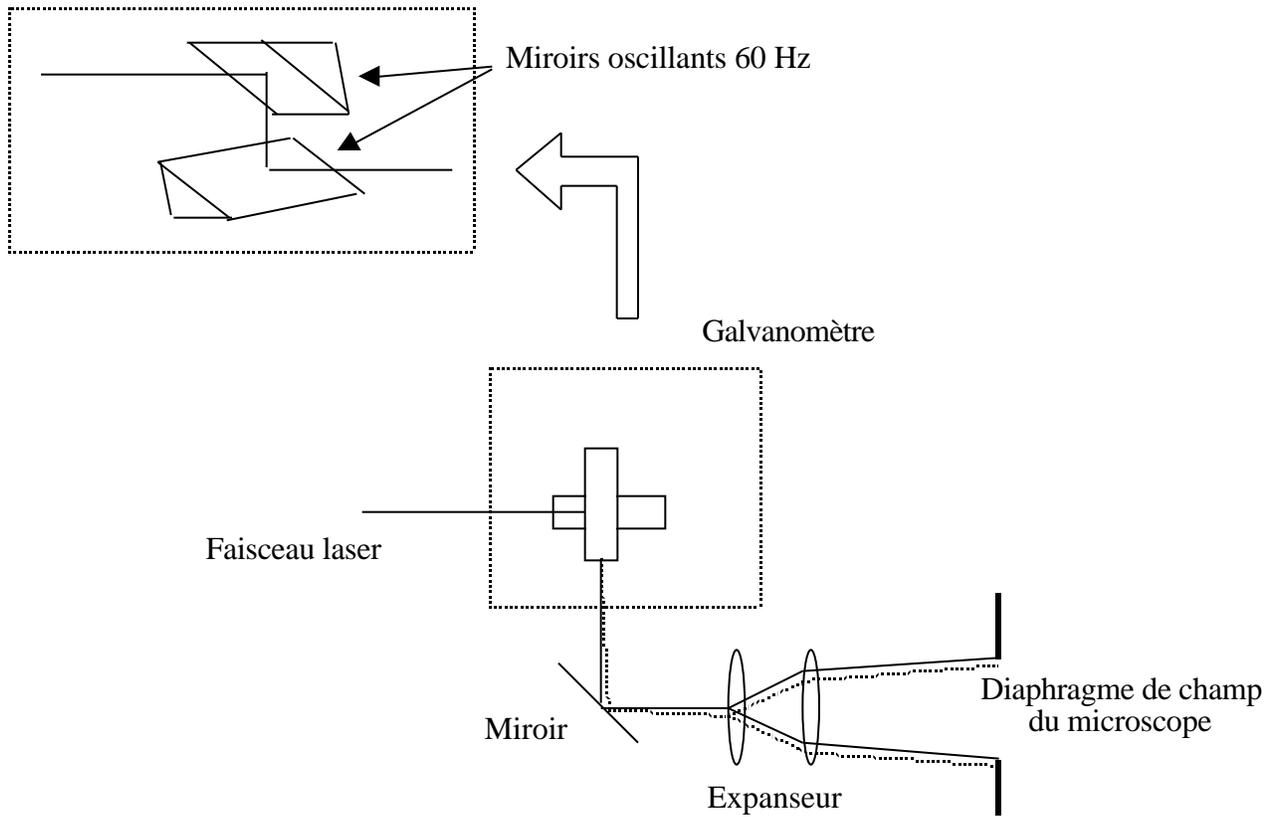


Figure IV. 2 : Schéma du galvanomètre avant l'expansion du faisceau laser à l'entrée du microscope. Le galvanomètre déplace à une fréquence de 60 Hz le faisceau laser de quelques millimètres à l'entrée de l'expenseur de faisceau.

Le résultat de cet éclairage, avec et sans galvanomètre, est présenté figure IV. 3.

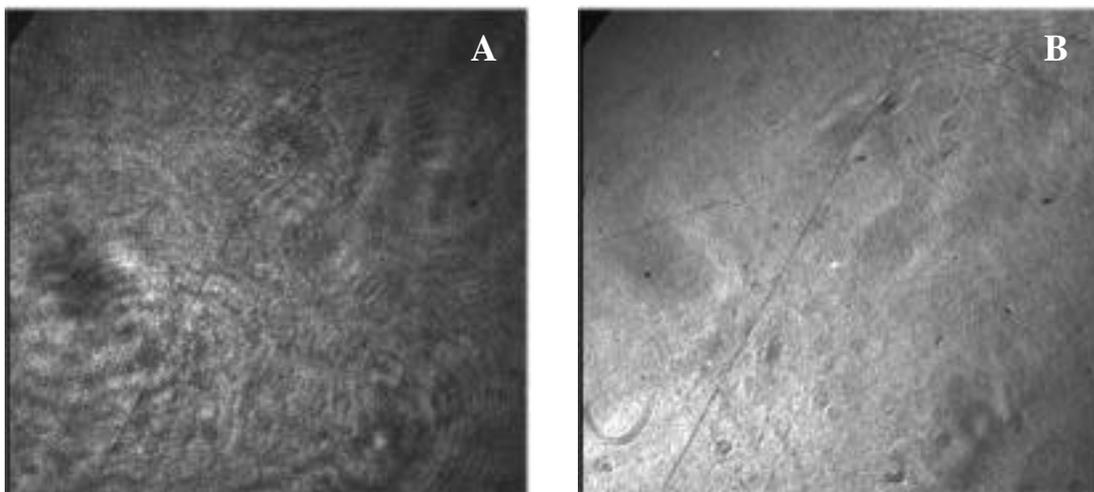


Figure IV. 3 : Eclairage laser sans et avec le galvanomètre. L'image correspond à la refraction de l'éclairage laser sur une surface réfléchissante (voir Fig. IV. 4) (on peut observer des stries droites sur cette surface) en utilisant un objectif x100 à immersion à huile (ON = 1,3). (A) Eclairage sans galvanomètre ; (B) Eclairage avec galvanomètre. On peut observer des franges d'interférences concentriques sur l'image A qui ont disparu sur l'image B.

Une autre méthode consistant à injecter le faisceau laser dans une fibre, à agiter cette fibre à basse fréquence (quelques Hertz), à utiliser l'ouverture numérique de la sortie de la fibre pour faire diverger le faisceau et à recolimer le faisceau à l'aide d'une lentille convergente, donne aussi de très bon résultats pour une illumination plein champ homogène (P. Bastiaens, communication personnelle). Notre choix ne s'est pas porté sur cette méthode. En effet, même si le montage optique du doubleur de fréquence corrige l'achromaticité du système par une ligne de prismes en sortie, le pointé du laser n'est pas assez précis pour conserver les réglages d'injection dans la fibre lorsque l'on change la longueur d'onde d'excitation dans l'intervalle 380-495 nm. Dans le système que nous avons choisi, la précision du pointé est moins drastique.

IV. 1. 1. 2. Optimisation de la réponse temporelle

En utilisant comme échantillon une surface parfaitement réfléchissante et en utilisant un bloc dichroïque (épifluorescence) constitué uniquement d'un miroir dichroïque, les quelques photons provenant de la réflexion de l'excitation transmis par le miroir sont suffisants pour acquérir la réponse instrumentale ou IRF (Fig. IV. 4). Optimiser le système temporellement consiste à contrôler la forme de l'IRF, à diminuer ou faire disparaître les pré-pulses et à minimiser la largeur à mi-hauteur ou FWHM.

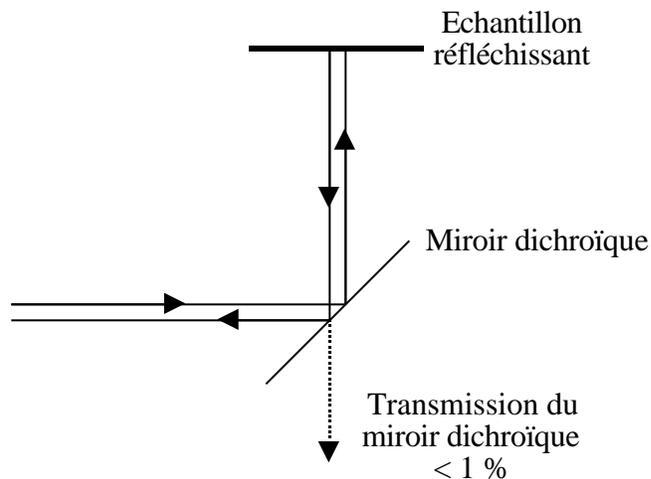


Figure IV. 4 : Chemin optique pour l'acquisition de l'IRF.

Le premier paramètre qui joue directement sur l'IRF est le signal provenant de la photodiode. L'intensité du laser dirigé sur la photodiode est un paramètre critique. Si l'intensité est trop faible, il n'y a pas de signal, si l'intensité est trop forte, la photodiode est éblouie et le signal délivré est constitué de plusieurs pulses, correspondant au pulse principal et aux rebonds caractéristiques de la réponse de la photodiode. Dans ce cas, les rebonds ne sont plus seuillés par l'électronique et le signal de la photodiode est faussé, ce qui influe directement sur l'IRF. Dans un fonctionnement normal, les rebonds sont faibles et sont seuillés au niveau du pré-amplificateur et du discriminateur. Pour contrôler le signal de la photodiode, deux diagnostics sont mis en oeuvre : (i) l'analyse du signal (fréquence et forme de l'impulsion) après le pré-amplificateur par un oscilloscope à très grande fréquence (7 GHz), et (ii) le comptage des impulsions en sortie de discriminateur pour valider la fréquence (Fig. IV. 5). Pour régler la photodiode, quatre paramètres interviennent : (i) l'atténuation du rayonnement laser fondamental résiduel par les filtres de densité optique, (ii) le pointé du faisceau laser sur la photodiode réglable à l'aide d'un miroir de renvoi, (iii) l'intensité du courant appliqué au pré-amplificateur, et (iv) le réglage du seuil à l'entrée du discriminateur (Fig. IV. 5).

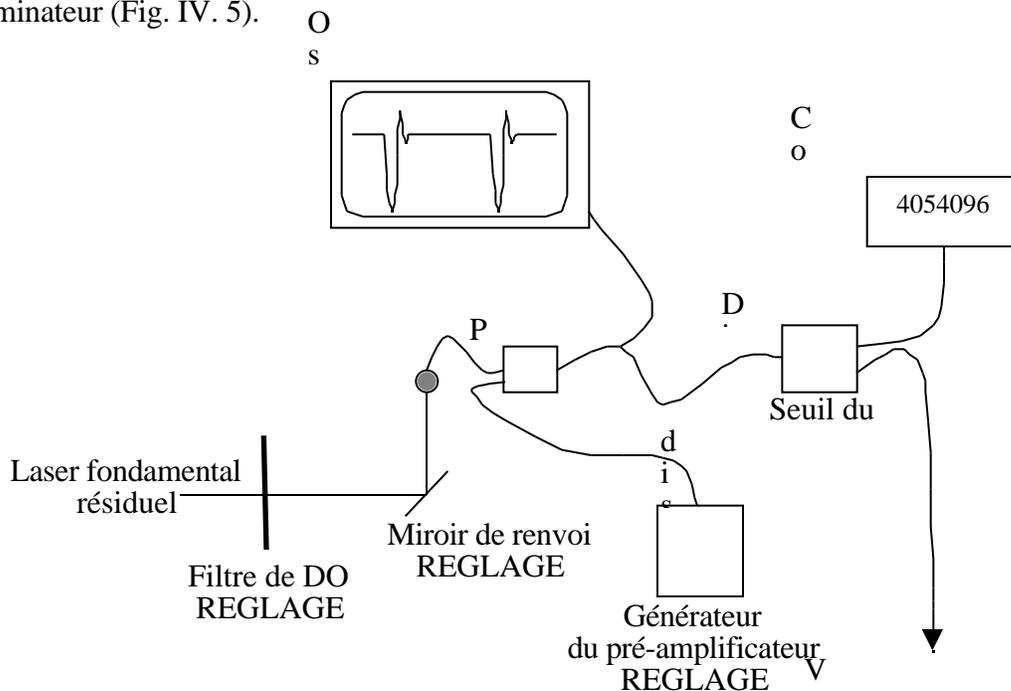


Figure IV. 5 : Réglage du signal photodiode.

Ce réglage est constitué de quatre éléments : atténuation du laser, pointé du laser sur la photodiode, puissance de préamplification et seuillage du signal à l'entrée du discriminateur. Deux éléments diagnostiques permettent le réglage de la forme et la fréquence des signaux : un oscilloscope ultra-rapide et un compteur d'impulsions.

L'autre paramètre jouant sur l'IRF est le signal provenant du DL. De la même manière, le signal est pré-amplifié et discriminé. Les paramètres électroniques d'intensité du courant appliqué au pré-amplificateur et de réglage du seuil à l'entrée du discriminateur sont optimisables. Un autre paramètre inhérent au détecteur est la valeur de la haute tension appliquée au détecteur et principalement aux galettes de micro-canaux. Ce paramètre est crucial pour un bon réglage de la réponse temporelle. De plus, tous ces réglages sont inter-dépendants et la seule approche raisonnable est empirique.

Le signal provenant du DL et donc l'IRF dépend aussi des paramètres optiques. Si le système optique d'illumination est mal réglé, des pré-pulses apparaissent sur l'IRF correspondant à quelques photons d'excitation ayant été réfléchis sur le miroir dichroïque ou sur la face d'entrée de l'objectif. Bien qu'ils soient traités anti-reflet, la sensibilité du détecteur fait qu'il détecte quelques photons dont le chemin optique est plus court, donc générant des pré-pulses. Cet aspect s'avère d'autant plus crucial que seul les photons d'excitation génèrent des pré-pulses, on ne les retrouve pas dans les déclin. Pour contourner ce problème, on peut acquérir l'IRF en utilisant l'émission de fluorescence d'une molécule ayant une durée de vie très courte (par exemple l'erythrosine, 100 ps). Pour notre système, 100 ps est une valeur non négligeable par rapport à la FWHM de l'IRF, et nous n'avons pas retenu cette méthode. Une démarche empirique des réglages optiques nous a permis de largement minimiser ces pré-pulses.

En routine, la réponse temporelle est de : $FWHM = 127 \pm 22$ ps (SD, $n = 21$). La figure IV. 6 présente la meilleure IRF obtenue correspondant à $FWHM = 90$ ps. On peut observer un léger pré-pulse, de rapport 1/1000 par rapport au pulse principal.

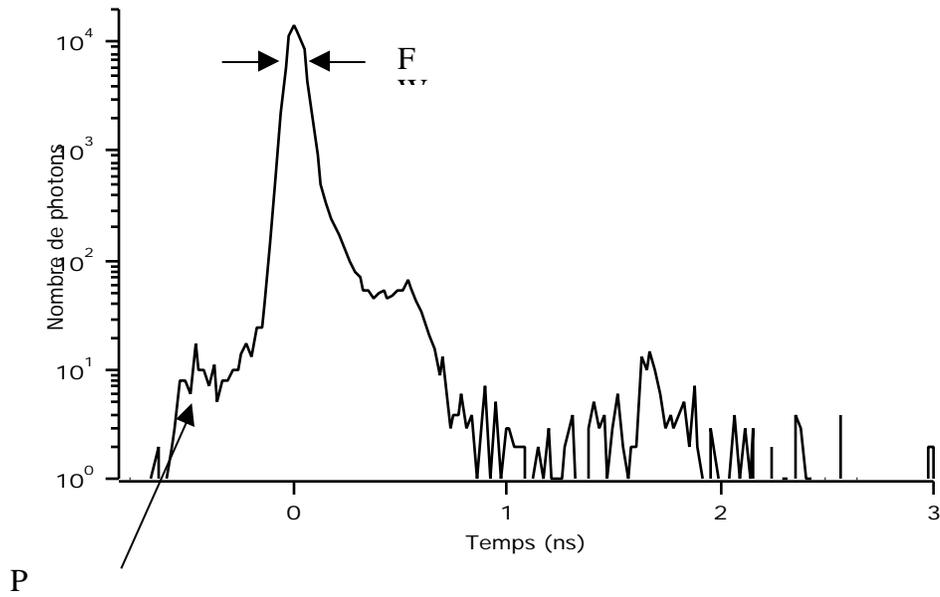


Figure IV. 6 : IRF optimisée obtenue sur le système DL.

IV. 1. 1. 3. Bruit et rapport signal/bruit

En accumulant les photons provenant d'une lampe électrique, donc complètement décorrélés en temps (le réseau électrique génère un bruit contenant la fréquence de 60 Hz), on peut mesurer la réponse du bruit sur toute la fenêtre de temps de l'acquisition. La figure IV. 7 présente un ajustement linéaire de cette acquisition. Le coefficient directeur de cet ajustement est nul ($b = -3,87 \cdot 10^{-6} \pm 3,35 \cdot 10^{-5}$). Le bruit accumulé par le DL est complètement décorrélé en temps. Ainsi, il n'y a pas addition d'un bruit corrélé en temps au déclin de fluorescence.

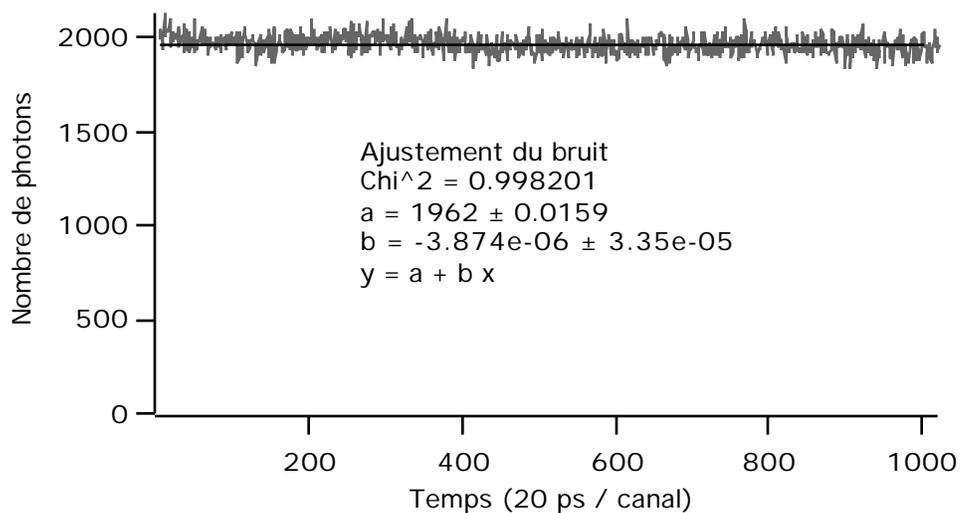


Figure IV. 7 : Ajustement du bruit compté par le DL.
Le niveau compté est indépendant du temps signifiant qu'il n'existe pas de corrélation temporelle pour le bruit.

C'est parce que le bruit, qu'il soit électronique ou photonique, n'est pas corrélé en temps que les détecteurs de photons uniques corrélés en temps sont si sensibles. Le signal, lui, est corrélé en temps et donc le rapport signal sur bruit augmente automatiquement. On mesure ce rapport sur l'IRF comme le rapport du nombre de photons moyen détecté par canal dans une zone sans signal par rapport au maximum de l'IRF. Ce rapport correspond à l'échelle dynamique accessible par le détecteur. Dans des conditions normales d'utilisation du DL, l'échelle dynamique est de l'ordre de 10^5 . En prenant des précautions de noir absolu autour du système, la meilleure échelle dynamique mesurée est de $9,3 \cdot 10^5$.

IV. 1. 1. 4. Calibration spatiale

La calibration spatiale consiste à repérer la surface active du DL par rapport à une image CCD, à caractériser ses dimensions, à vérifier la linéarité de la réponse spatiale du DL et à calibrer spatialement les canaux. Une règle microscopique ($10 \mu\text{m}$ par division) a été utilisée comme échantillon pour cette caractérisation. Les propriétés de réflexion de la lumière sur chaque ligne de la règle ont permis d'acquérir des données sous forme d'une IRF (Fig. IV. 8). On a pu alors caractériser les dimensions de la surface active du DL qui avait une réponse linéaire. En effet, des effets de bord aux extrémités de la ligne conductrice du DL ont amené à ne prendre en compte que la partie centrale du détecteur qui, avec l'échantillonnage choisi de 256 canaux, correspond à 160 canaux entre le canal 44 et le canal 204. Dans cet intervalle, la réponse est linéaire et correspond à $50 \mu\text{m}$ au niveau de l'échantillon en utilisant l'objectif $\times 100$ et l'optovar ($\times 1,6$). Un canal correspond donc à $0,31 \mu\text{m}$.

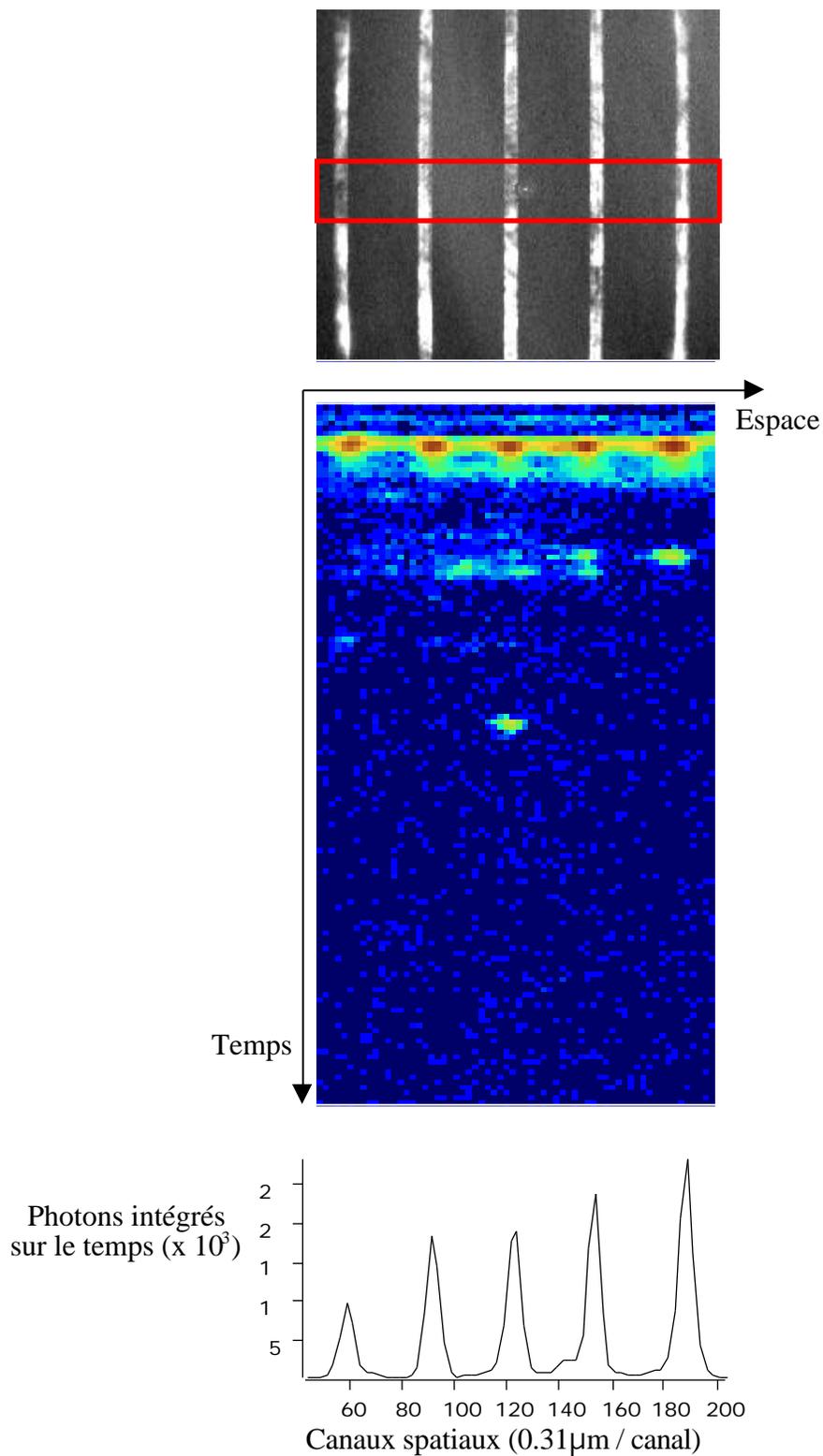


Figure IV. 8 : Acquisition DL de la réflexion du laser sur une règle micrométrique. L'image du haut correspond à l'acquisition CCD. La surface active du détecteur DL est représenté par un rectangle sur cette image. L'acquisition DL est représentée par son histogramme 2D (au milieu). L'intégrale simple en fonction du temps de cet histogramme correspond au nombre de photons comptés en fonction de la position spatiale et est représentée sous la forme d'une courbe (en bas).

Concernant la largeur de la surface active, son repérage a été effectué en déplaçant perpendiculairement une ligne réfléchissante parallèle au DL et en mesurant les photons détectés par le DL (Fig. IV. 9). La largeur mesurée correspond à $8\ \mu\text{m}$ au niveau de l'échantillon. La surface active, échantillonnée sur 160 canaux est donc de $50\ \mu\text{m}$ sur $8\ \mu\text{m}$ (obj. x100, x1,6). Cette surface a été repérée par rapport à une acquisition CCD. Pour les études cellulaires, l'image CCD permet donc de déterminer quelle région cellulaire correspond à l'acquisition du DL.

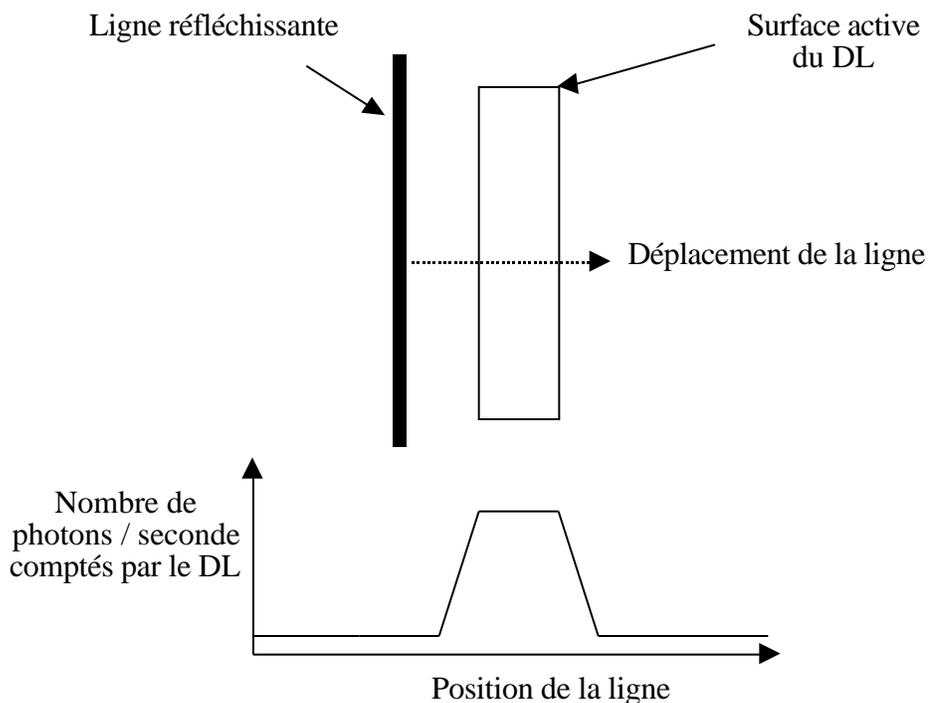


Figure IV. 9 : Mode opératoire pour la caractérisation de la largeur de la surface active du DL.

Lorsque la ligne réfléchissante se trouve positionnée dans la surface active du DL, le nombre de photons comptés par seconde est maximum. En déplaçant cette ligne hors de la surface active, le nombre de photons comptés est minimum. La largeur de la surface active est repérée en faisant varier la position de la ligne et en analysant simultanément le nombre de photons comptés.

IV. 1. 1. 5. Calibration temporelle

La calibration temporelle consiste à vérifier la linéarité de la réponse temporelle sur toute la fenêtre de temps échantillonnée sur les 1024 canaux et à calibrer temporellement un canal. Pour cela, une acquisition séquentielle de l'IRF en introduisant différents retards sur le signal de la photodiode a été effectuée. La figure IV. 10 présente l'histogramme 2D de cette acquisition et son profil en fonction des canaux temporels.

Histogramme 2 D Delay-Line

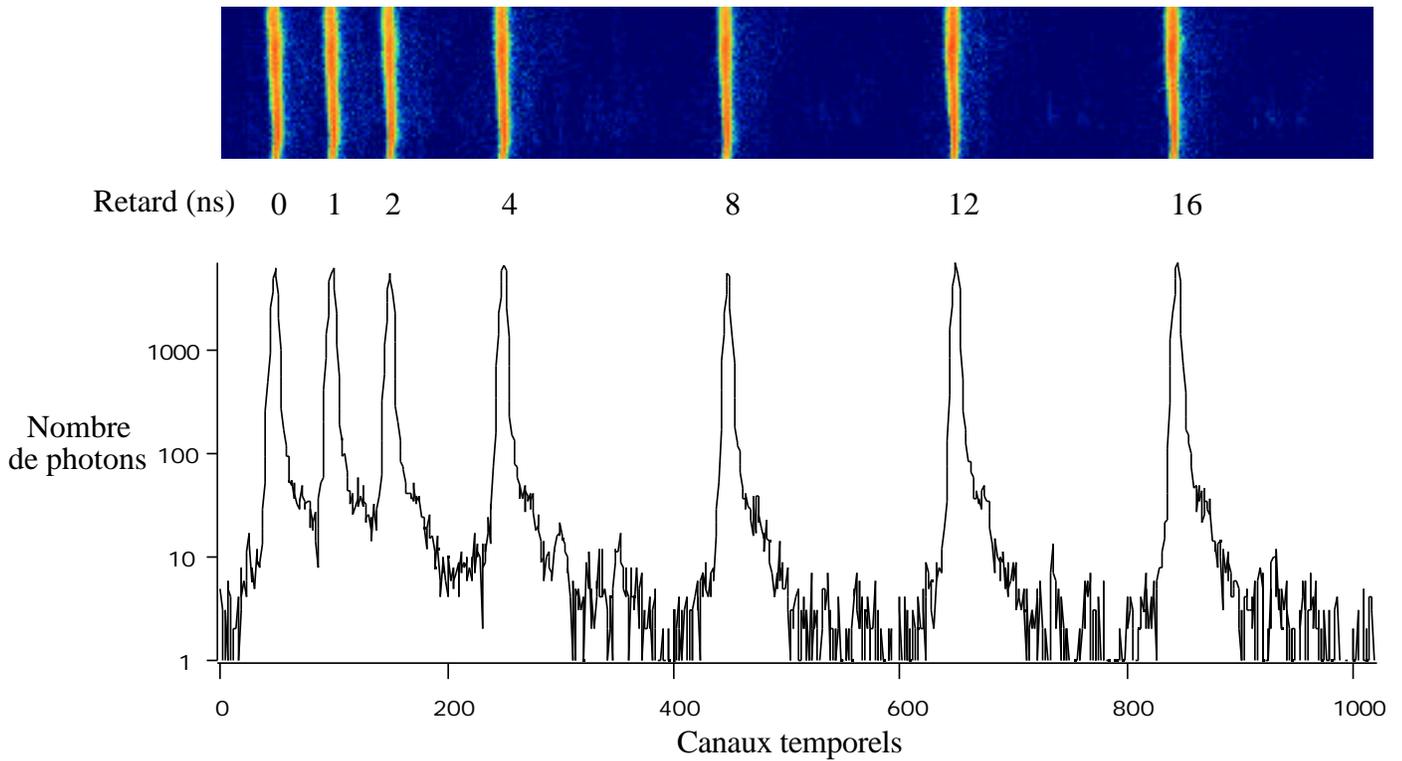


Figure IV. 10 : Acquisition cumulée de l'IRF avec différents retards introduits dans la chaîne de comptage. L'image du haut représente l'histogramme 2D de cette acquisition. L'intégrale simple en fonction de la position de cet histogramme correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe (en bas).

On peut initialement remarquer que la forme de l'IRF n'est pas modifiée suivant le retard introduit et donc sa position dans la fenêtre de temps. De plus, la position du maximum de l'IRF en fonction du retard est présentée sous la forme d'un graphe (Fig. IV. 11).

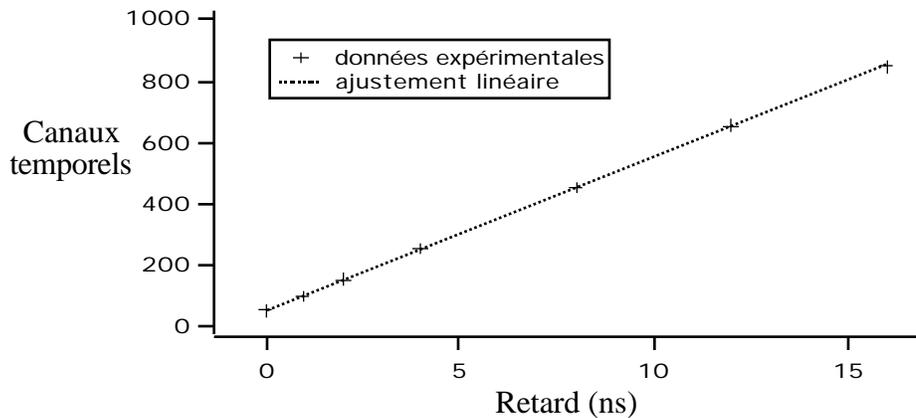


Figure IV. 11 : Position des IRF en fonction des retards introduits dans la chaîne de comptage. L'ajustement linéaire de ces données est satisfaisant et l'inverse du coefficient directeur de cette droite présente la calibration temporelle en ns / canal.

L'ajustement linéaire de ces points prouve la linéarité de la réponse temporelle et permet de calculer que, pour cet échantillonnage (celui utilisé pour mesurer les déclin de fluorescence des GFP et mutants), chaque canal temporel correspond à 20 ps.

IV. 1. 1. 6. Validation de la mesure de durée de vie

Pour valider la mesure des durées de vie de fluorescence avec le DL, la rhodamine 6G, Rd6G, en solution dans le butanol a été utilisée comme standard, sachant que cette molécule a un déclin strictement mono-exponentiel en solution. L'histogramme 2D des photons émis par cette solution fluorescente a été analysé de deux manières différentes : (i) en analysant le déclin total, ce qui correspond à intégrer l'histogramme suivant la direction spatiale sur toute la longueur du DL, ou (ii) en analysant indépendamment chaque déclin correspondant à l'intégration sur dix canaux spatiaux. Ainsi, pour le déclin total, présenté figure IV. 12, une unique durée de vie de 3,65 ns a été trouvée, correspondant bien à la durée de vie attendue de la Rd6G dans le butanol.

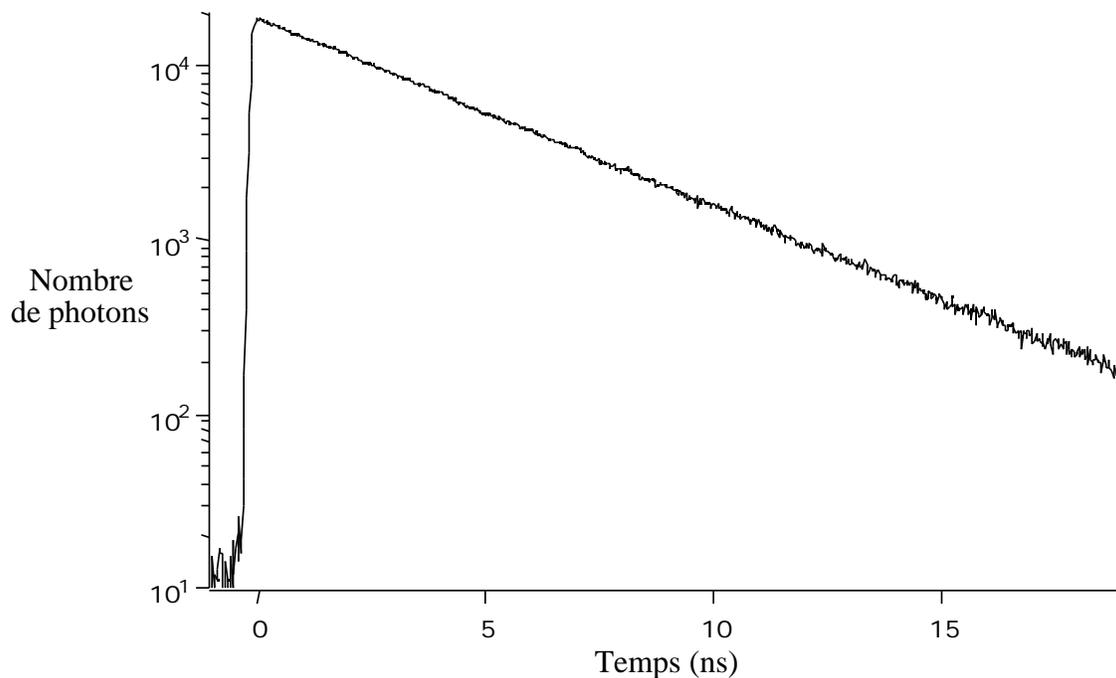


Figure IV. 12 : Déclin de fluorescence de la Rd6G dans le butanol mesuré par le système DL.

La courbe présentée est l'intégrale simple en fonction de la position de l'histogramme d'acquisition 2D du DL et correspond au déclin total mesuré soit le nombre total de photons comptés quelle que soit sa position spatiale en fonction du temps.

La figure IV. 13 présente simultanément le résultat des deux analyses, montrant la variation de la durée de vie analysée localement par rapport à l'analyse totale. On remarque que cette variation est très faible ($\pm 1\%$), ce qui valide la mesure de durée de vie sur toute la longueur du DL.

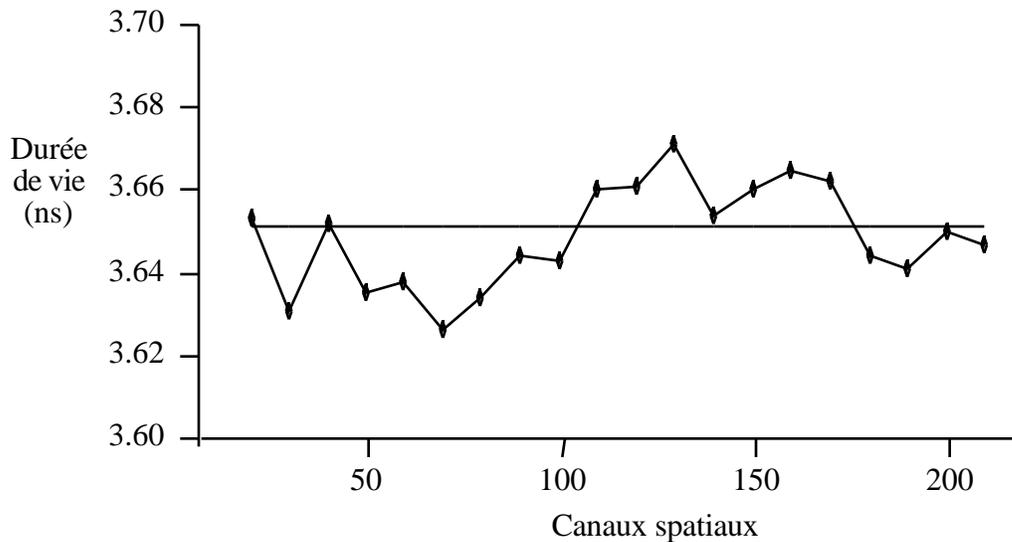


Figure IV. 13 : Variation de la durée de vie mesurée en fonction de la position spatiale. Chaque déclin local a été analysé séparément. Les résultats de ces différentes analyses sont présentés sous la forme de points en fonction de la position. Est aussi représentée, sous la forme d'une droite, la durée de vie issue du déclin total présenté figure IV. 12.

IV. 1. 2. L'anisotropie de fluorescence sous microscope

Les mesures de déclin d'anisotropie de fluorescence sous microscope pour l'étude de la dynamique de macromolécules ont posé deux types de problèmes : (i) l'effet de la dépolarisation induite par les diverses optiques du microscope sur la mesure des déclins d'anisotropie, et (ii) la normalisation des déclins de l'intensité parallèle et perpendiculaire pour la détermination de l'anisotropie. Cette problématique s'est avérée essentielle à la validation des expériences d'anisotropie effectuées en cellule vivante sur le système confocal installé par l'équipe de Robert Pansu à Cachan (Tramier et al., 2001, Tramier et al., 2000).

IV. 1. 2. 1. Normalisation des déclins

Dans le cas de la diffusion rotationnelle d'une petite molécule étudiée par déclin d'anisotropie, la normalisation des déclins parallèle et perpendiculaire s'effectue simplement en

faisant correspondre les queues des deux déclinés aux temps longs (méthode du "Tail-Matching"). En effet, dans ce cas, on a $\tau_{\parallel} = \tau_{\perp}$ (voir Ch. II. 3. 3), et l'anisotropie est nulle aux temps longs, ce qui correspond au fait que le système a alors perdu la mémoire de son orientation initiale et que les intensités, parallèle et perpendiculaire, sont égales (Fig. IV. 14).

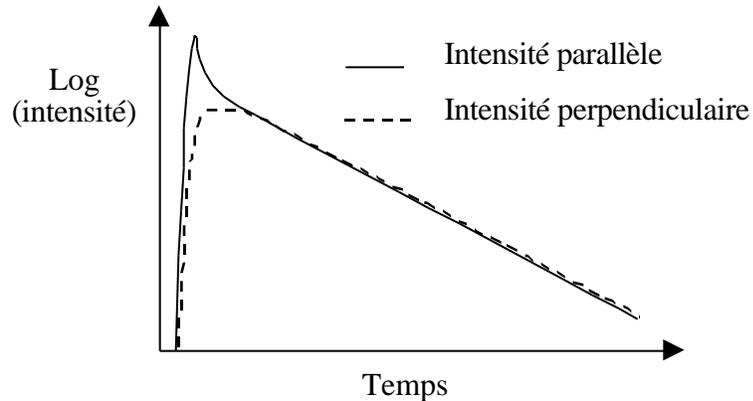


Figure IV. 14 : Représentation théorique des déclinés parallèle et perpendiculaire pour une anisotropie nulle aux temps longs.

Par contre, lorsque l'anisotropie ne relaxe pas complètement dans le temps du déclin de fluorescence (Fig. IV. 15), cette normalisation ne peut pas s'effectuer.

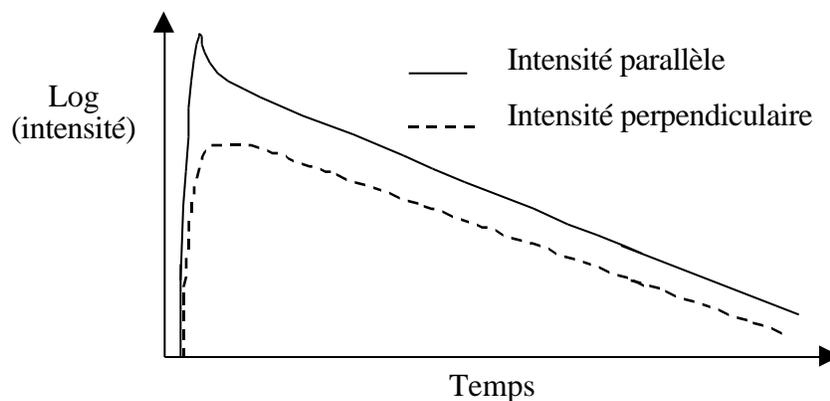


Figure IV. 15 : Représentation théorique des déclinés parallèle et perpendiculaire pour une anisotropie non nulle aux temps longs.

Pour les mesures de déclin d'anisotropie concernant la dynamique de macromolécules, il a été nécessaire d'introduire une autre méthode de normalisation qui tient compte des variations

d'intensité d'excitation et d'émission dues aux optiques et des conditions propres à l'acquisition de chaque déclin.

Cette méthode repose sur la mesure des quatre intensités stationnaires, I_{vh} , I_{vv} , I_{hv} et I_{hh} , correspondant aux quatre orientations respectives de la polarisation d'excitation et d'émission, immédiatement avant l'acquisition des déclin parallèle, $i_{vh}(t)$, et perpendiculaire, $i_{hh}(t)$. Ces déclin expérimentaux sont alors normalisés en utilisant la mesure des quatre intensités stationnaires. Pour corriger du temps d'acquisition, du photoblanchiment éventuel ou des fluctuations d'intensité du laser exciteur durant les acquisitions du déclin parallèle et perpendiculaire, une première normalisation consiste à comparer les intensités stationnaires avec l'intégrale sous la courbe des deux déclin. Considérant que cette intégrale est proportionnelle à l'intensité de fluorescence, on a alors pour $i_{vh}^N(t)$ et $i_{hh}^N(t)$, les déclin normalisés :

$$i_{vh}^N(t) = [I_{vh} / \int i_{vh}(t) dt] i_{vh}(t) \quad (\text{IV. 1. 1})$$

et

$$i_{hh}^N(t) = [I_{hh} / \int i_{hh}(t) dt] i_{hh}(t) \quad (\text{IV. 1. 2})$$

T, le facteur de correction temporel est donc défini par

$$i_{vh}^N(t) / i_{hh}^N(t) = T i_{vh}(t) / i_{hh}(t) \quad (\text{IV. 1. 3})$$

où

$$T = [I_{vh} \int i_{hh}(t) dt] / [I_{hh} \int i_{vh}(t) dt] \quad (\text{IV. 1. 4})$$

Ces déclin normalisés ne correspondent pas aux déclin parallèles et perpendiculaires réels. En effet, selon les différentes orientations de polarisation à l'excitation et à l'émission, l'efficacité de transmission de la lumière à l'intérieur du système optique et plus particulièrement du microscope sont différentes. La figure IV. 16 présente la géométrie du système confocal.

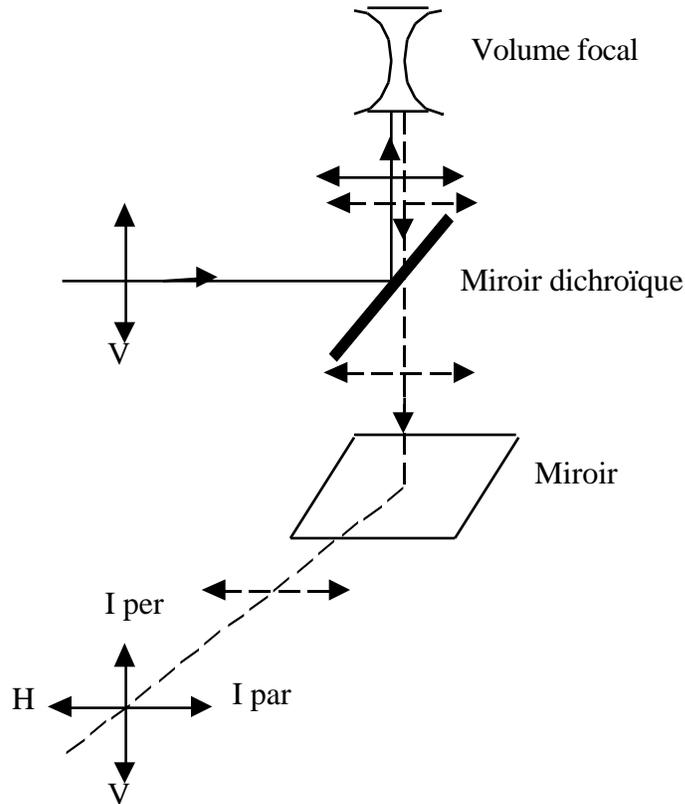


Figure IV. 16 : Chemin optique et configuration géométrique de l'anisotropie sous microscope. En excitant avec une lumière polarisée suivant la direction verticale, à l'émission la direction de polarisation parallèle à celle d'excitation est la direction horizontale. De même, la direction perpendiculaire est la direction verticale. Réciproquement, en excitant avec une lumière polarisée suivant la direction horizontale, la direction parallèle est la verticale et la direction perpendiculaire est l'horizontale.

La relation entre les intensités stationnaires parallèles et perpendiculaires réelles, I_{par} et I_{per} , et les quatre intensités stationnaires mesurées donne :

$$\begin{aligned}
 I_{vh} &= S_v S'_h I_{par} \\
 I_{vv} &= S_v S'_v I_{per} \\
 I_{hv} &= S_h S'_v I_{par} \\
 I_{hh} &= S_h S'_h I_{per}
 \end{aligned}
 \tag{IV. 1. 5}$$

où S_v et S_h sont les efficacités de transmission à l'excitation pour la lumière polarisée verticalement et horizontalement, respectivement, et S'_v et S'_h celles à l'émission. En considérant les équations IV.

1. 5, on peut écrire :

$$I_{vh} / I_{hh} = [S_v / S_h] [I_{par} / I_{per}]
 \tag{IV. 1. 6}$$

et

$$(I_{vh} I_{vv}) / (I_{hv} I_{hh}) = (S_v / S_h)^2 \quad (\text{IV. 1. 7})$$

En combinant les équations IV. 1. 6 et IV. 1. 7, on a :

$$I_{vh} / I_{hh} = [(I_{vh} I_{vv}) / (I_{hv} I_{hh})]^{1/2} I_{par} / I_{per} \quad (\text{IV. 1. 8})$$

Pour $i_{vh}^N(t)$ and $i_{hh}^N(t)$, les déclinés normalisés temporellement, l'équation IV. 1. 8 devient

$$i_{vh}^N(t) / i_{hh}^N(t) = G i_{par}(t) / i_{per}(t) \quad (\text{IV. 1. 9})$$

où G, le facteur de correction géométrique s'écrit

$$G = [(I_{vh} I_{vv}) / (I_{hv} I_{hh})]^{1/2} \quad (\text{IV. 1. 10})$$

Dans l'équation IV. 1. 9, $i_{par}(t)$ et $i_{per}(t)$ correspondent aux déclinés parallèle et perpendiculaire réels, respectivement. En combinant les équations IV. 1. 3 et IV. 1. 9, on a :

$$i_{par}(t) / i_{per}(t) = (T / G) (i_{vh}(t) / i_{hh}(t)) \quad (\text{IV. 1. 11})$$

La fonction d'anisotropie, $r(t)$, est définie par (voir Eq. II. 3. 12) :

$$r(t) = [i_{par}(t) - i_{per}(t)] / [i_{par}(t) + 2i_{per}(t)] \quad (\text{IV. 1. 12})$$

En utilisant l'équation IV. 1. 11, $r(t)$ est directement obtenue à partir des déclinés expérimentaux, $i_{vh}(t)$ et $i_{hh}(t)$, en utilisant T et G mesurés à chaque expérience d'anisotropie :

$$r(t) = [T i_{vh}(t) - G i_{hh}(t)] / [T i_{vh}(t) + 2 G i_{hh}(t)] \quad (\text{IV. 1. 13})$$

Ainsi, normaliser les déclinés expérimentaux consiste à multiplier réciproquement $i_{vh}(t)$ et $i_{hh}(t)$ par T et G.

IV. 1. 2. 2. Validation de la mesure d'anisotropie

Pour valider la normalisation et la mesure d'anisotropie sur le système confocal, des mesures de déclinés d'anisotropie de la Rd6G comme modèle ont été entreprises (Tramier et al., 2000). En solution dans le butanol, le temps de corrélation rotationnel de la Rd6G est de l'ordre de 875 ± 50 ps (Philips et al., 1985), en cohérence avec la taille de la molécule et la viscosité du butanol. Sachant que pour la Rd6G dans le butanol $\tau \ll \tau_c$, il est possible de comparer les résultats des ajustements obtenus après la normalisation par la méthode de "Tail-Matching" et par la méthode

présentée précédemment (Ch. IV. 1. 2. 1). Le modèle choisi pour les ajustements correspond à la diffusion rotationnelle d'une sphère (Eq. II. 3. 16). Dans ce cas, les équations utilisées pour cet ajustement sont présentées chapitre III. 3. 1 (Eq. III. 3. 5 et III. 3. 6).

Le résultat des différents ajustements de cette mesure effectuée à deux ouvertures numériques différentes (ON = 1 et 1,3) de l'objectif x100 est présenté table IV. 1.

Table IV. 1 : Comparaison des paramètres de diffusion rotationnelle de la Rd6G dans le butanol obtenus par différentes méthodes de normalisation et à différentes ON de l'objectif x100.

	a	(ns)	r ₀	(ps)
"Tail-matching"				
ON = 1,3	15,4	3,4	0,296	830
	±0,4	±0,1	±0,024	±120
ON = 1	13,7	3,4	0,320	820
	±0,4	±0,1	±0,022	±90
Normalisation expérimentale				
ON = 1,3	15,1	3,4	0,292	770
	±0,4	±0,1	±0,036	±100
ON = 1	12,5	3,4	0,320	800
	±0,4	±0,1	±0,021	±70

a = facteur pré-exponentiel, = durée de vie de fluorescence, r₀ = anisotropie initiale et = temps de corrélation rotationnelle.

Les valeurs obtenues sont indépendantes de la méthode de normalisation et correspondent aux valeurs attendues. Ce résultat permet de valider la mesure de déclin d'anisotropie sous microscope en mode confocal et aussi la méthode qui permet de normaliser les déclins parallèle et

perpendiculaire sans faire l'hypothèse d'une relaxation complète de l'anisotropie aux temps longs, ce qui d'ailleurs est fort improbable pour les études de dynamique de macromolécules en cellules vivantes.

IV. 1. 2. 3. Variation de r_0 en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif

En analysant les différentes valeurs de r_0 , l'anisotropie initiale, dans la table IV. 1, on peut remarquer que cette valeur varie en fonction de l'ouverture numérique (ON) de l'objectif. La valeur théorique de r_0 pour la Rd6G correspond à la valeur maximale de 0,4 sachant que pour cette molécule les dipôles d'absorption et d'émission sont parallèles (Ch. II. 3. 1). Axelrod a décrit théoriquement cette situation (Axelrod, 1979, Axelrod, 1989). Son approche théorique explicite la diminution de r_0 lorsque l'ON de l'objectif augmente. Pour vérifier que la diminution de r_0 que nous mesurons correspond au développement théorique d'Axelrod, différentes mesures de déclin d'anisotropie de la Rd6G dans le butanol ont été effectuées en faisant varier l'ON de l'objectif (entre 0,8 et 1,3). Les résultats expérimentaux sont présentés figure IV. 17, simultanément avec la courbe de variation issue du traitement théorique d'Axelrod.

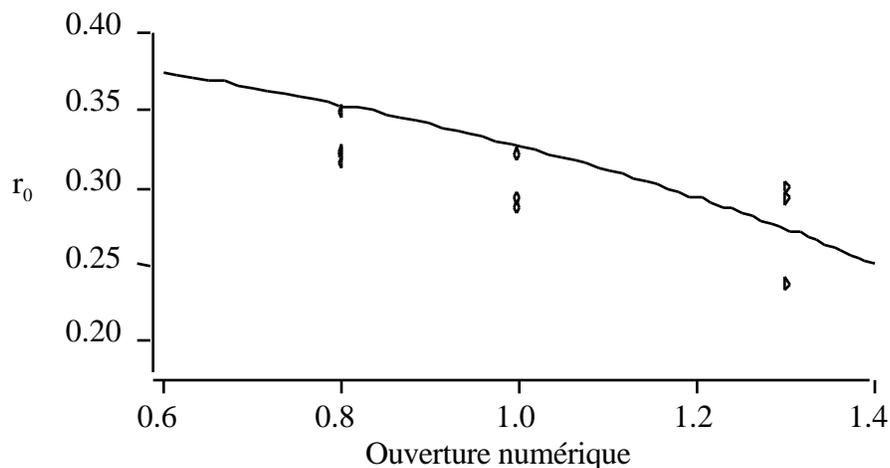


Figure IV. 17 : Dépendance de l'anisotropie initiale, r_0 , en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif. Les données expérimentales (symboles) correspondent à des mesures effectuées sur la Rd6G dans le butanol (objectif x100). La courbe théorique (ligne) provient du traitement mathématique effectué par D. Axelrod (1979).

On remarque que les résultats expérimentaux sont bien en accord avec la théorie. On ne peut pas exclure que certaines valeurs expérimentales de r_0 soient entachées d'une diminution supplémentaire correspondant à d'autres dépolarisations induites par différentes optiques du système. Néanmoins, ces dépolarisations parasites n'affectent pas de façon significative la mesure sous microscope des paramètres des déclins d'anisotropie. La diminution du r_0 à grande ouverture numérique de l'objectif n'est pas un obstacle à la caractérisation des cinétiques de dépolarisation de la fluorescence.

IV. 2. Caractérisation des sondes fluorescentes utilisées en cellules vivantes

Pour étudier la dynamique et les interactions de macromolécules en cellule vivante en utilisant la technique des déclins de fluorescence, de nombreuses mises au point ont été nécessaires. Il s'agissait notamment de marquer sélectivement les macromolécules étudiées de manière à ce que l'étude en cellule vivante soit envisageable. De plus, pour analyser du mieux possible les déclins de fluorescence mesurés en cellule, une bonne connaissance des sondes utilisées et de leurs propriétés s'avère essentielle.

IV. 2. 1. La GFP

Une partie de mon travail a consisté à caractériser les différents déclins de fluorescence de la GFP et de ses variants spectraux en cellules, à étudier les variations de ces déclins pour les protéines fusion, à déterminer les valeurs de R_0 pour les différents couples de FRET et à caractériser l'anisotropie de fluorescence de la GFP seule en solution et en cellule. Concernant les études en cellule vivante, toutes ces expériences ont été effectuées après transfection en cellule Vero, lignée cellulaire de rein de singe.

IV. 2. 1. 1. Déclins de fluorescence de la GFP et variants spectraux

Les expériences présentées ici consistent à mesurer les déclins de fluorescence de la GFP et de ses variants spectraux exprimés en cellule. Les plasmides transfectés proviennent de Clontech : les plasmides présentant des mutations par rapport à la GFPwt (EGFP présentant les mutations F64L et S65T ; ECFP présentant les mutations F64L, S65T, Y66W, N1466I, M153T et V163A ; EYFP présentant les mutations S65G, V68L, S72A et T203Y ; EBFp présentant les mutations F64L, S65T, Y66H et Y145F) ainsi que le plasmide DsRed. Les différents spectres d'absorption et d'émission de ces protéines sont présentés figure IV. 18.

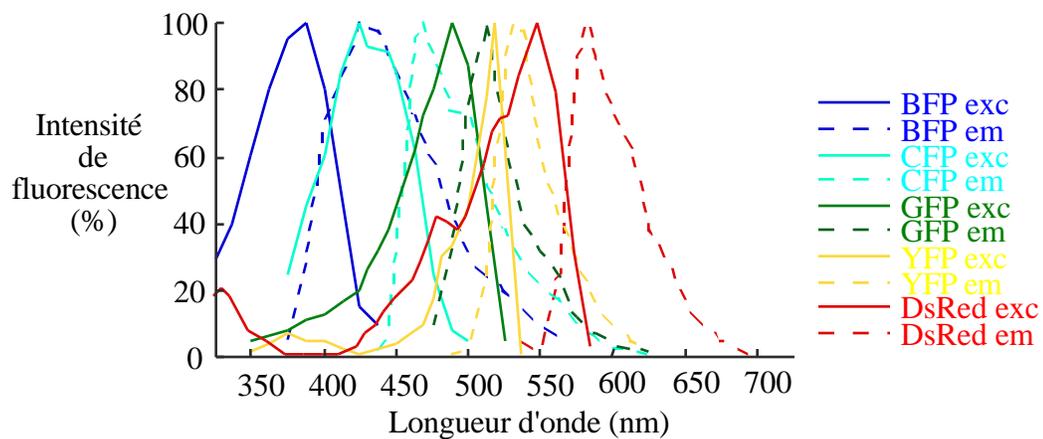


Figure IV. 18 : Spectres d'absorption et d'émission des protéines autofluorescentes.

La localisation cellulaire de ces protéines est homogène, tant dans le noyau (nucléoles exclus) que dans le cytoplasme (Fig. IV. 19).

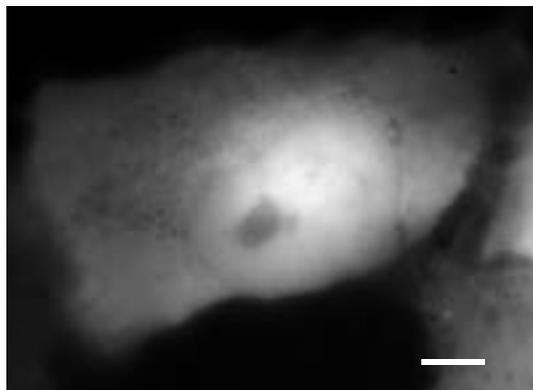


Figure IV. 19 : Localisation subcellulaire de la GFP exprimée en cellules Vero. L'image a été acquise par la caméra CCD en utilisant l'illumination de la lampe à vapeur de mercure (50 W) avec $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$. Barre = 10 μm .

Outre la caractérisation de chaque protéine auto-fluorescente par sa ou ses durées de vie, on a pu vérifier que les propriétés cinétiques de fluorescence ne variaient pas en fonction de la localisation cellulaire. La stabilité du chromophore et de ses propriétés dans différents contextes cellulaires sont un pré-requis important aux études de FRET et d'anisotropie.

IV. 2. 1. 1. 1. La GFP

La figure IV. 20 présente une acquisition DL de la fluorescence de la GFP en cellule vivante à $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$. La courbe présentée correspond au déclin total intégré sur toute la longueur du DL.

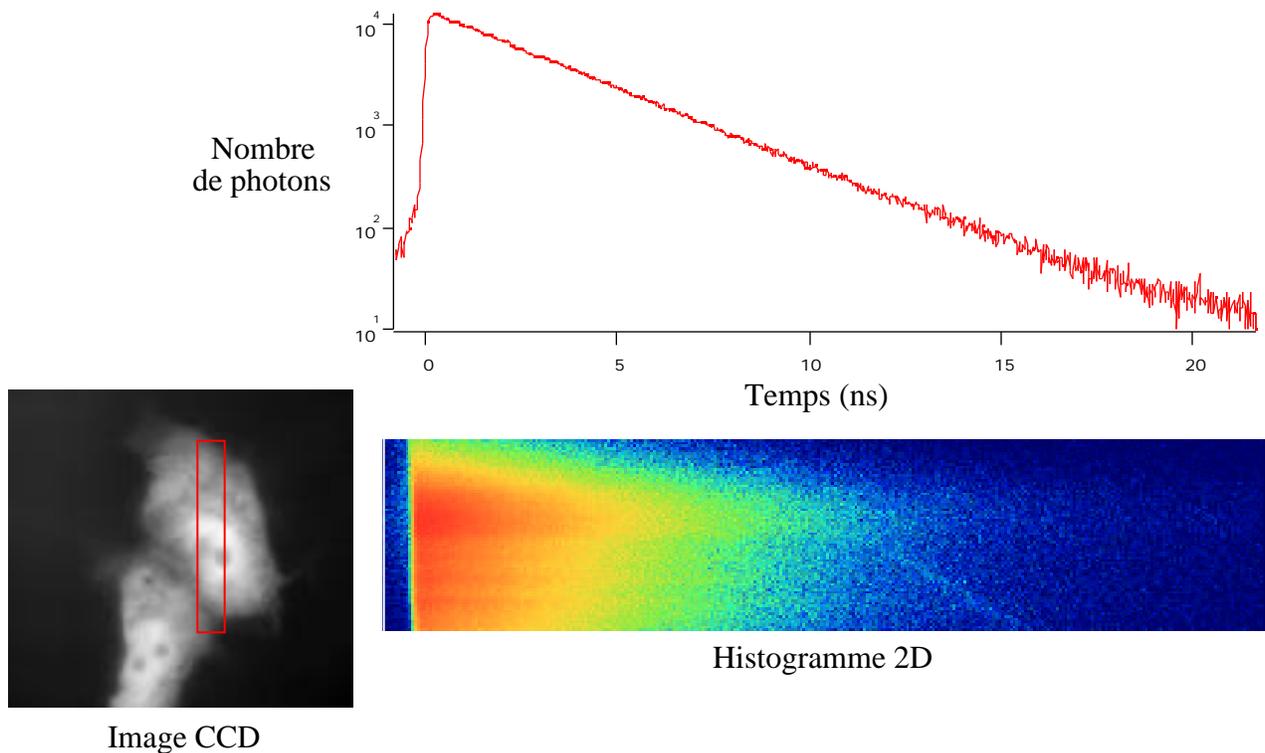


Figure IV. 20 : Acquisition DL de la GFP exprimée en cellules Vero. Sur l'image CCD est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition a été menée avec $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$ et est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés. L'intégrale simple de cet histogramme en fonction de la position correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe. C'est le déclin de fluorescence total de la GFP mesuré par le DL.

Cette courbe se présente, en échelle logarithmique, comme une droite, caractéristique de la forme mono-exponentielle du déclin. L'ajustement par un modèle monoexponentiel est satisfaisant et la

durée de vie mesurée est de $2,6 \pm 0,1$ ns. Cette durée de vie est identique tout le long de la ligne, quelle que soit la localisation subcellulaire. D'autres déclin de fluorescence de la GFP ont été obtenus sur le système confocal (Tramier et al., 2001) donnant les mêmes résultats. Ce résultat est en accord avec les valeurs obtenues en cellules par phase et modulation (Pepperkok et al., 1999, Swaminathan et al., 1997).

IV. 2. 1. 1. 2. La CFP

La figure IV. 21 présente une acquisition DL de la fluorescence de la CFP (C pour cyan) en cellule vivante à $\lambda_{exc} = 440$ nm et $470 < \lambda_{em} < 500$ nm.

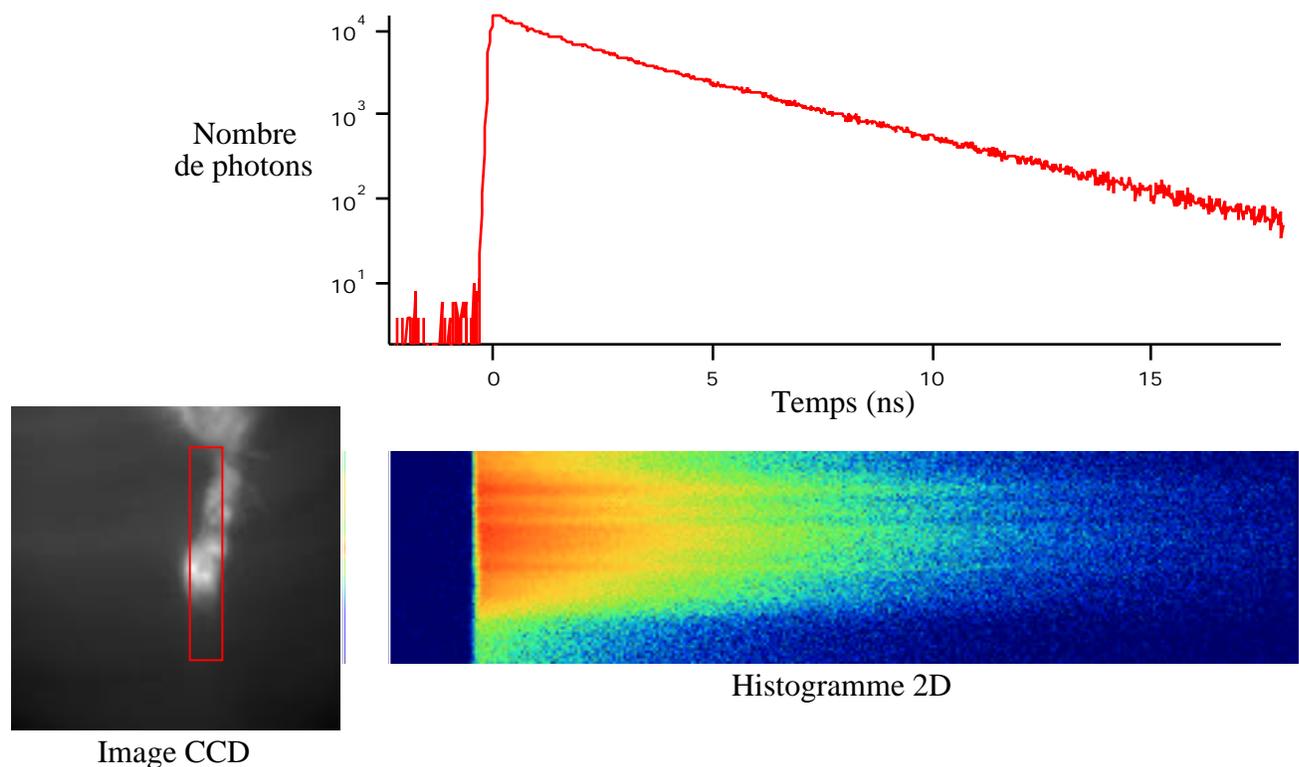


Figure IV. 21 : Acquisition DL de la CFP exprimée en cellules Vero. Sur l'image CCD est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition a été menée avec $\lambda_{exc} = 440$ nm et $470 < \lambda_{em} < 500$ nm et est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés. L'intégrale simple de cet histogramme en fonction de la position correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe. C'est le déclin de fluorescence total de la CFP mesuré par le DL.

On peut constater que la courbe représentée n'est pas droite, le déclin ne représente pas une cinétique mono-exponentielle. En effet, en ajustant la courbe expérimentale provenant du DL, on obtient pour la CFP deux durées de vie : 3,4 ns avec un coefficient pré-exponentiel de 0,6 et 1,3 ns avec un coefficient pré-exponentiel de 0,4 (la somme des coefficients pré-exponentiels a été normalisée à 1). Des ajustements locaux le long de la ligne du DL montrent que le déclin de fluorescence de la CFP ne varie pas en fonction de sa localisation sub-cellulaire. Pour comparer les différentes mesures effectuées dans différentes cellules, nous avons introduit la notion de durée de vie moyenne, $\langle \tau \rangle$, correspondant à

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum a_i \tau_i}{\sum a_i} \quad (\text{IV. 2. 1})$$

où a_i et τ_i sont le coefficient pré-exponentiel et la durée de vie de l'espèce i , respectivement. Les résultats de déclin de fluorescence de la CFP sont $\langle \tau \rangle = 2,49 \pm 0,18$ ns ($n = 4$).

La propriété bi-exponentielle du déclin de fluorescence de la CFP avait déjà été pressentie par des expériences de phase et modulation à une seule fréquence présentant des valeurs différentes entre la durée de vie calculée à partir du déphasage et la durée de vie calculée à partir de la démodulation (Pepperkok et al., 1999), résultat caractéristique d'un déclin multi-exponentiel. On peut penser que l'existence de deux bandes d'absorption et d'émission pour la CFP (Fig. IV. 22) correspondent à deux états différents du chromophore dont les vitesses de désexcitation seraient différentes, ce qui expliquerait le résultat bi-exponentiel.

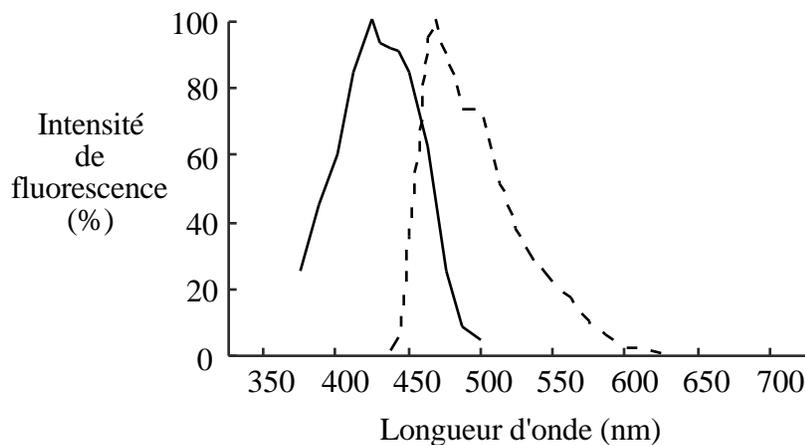


Figure IV. 22 : Spectre d'absorption (continu) et d'émission (pointillé) de la CFP.

En ce sens, les études en cellules menées par R. Pepperkok et collaborateurs en phase et modulation à deux longueurs d'onde d'excitation différentes, présentent des résultats ($\tau = 2,07$ ns et $\tau_M = 2,68$ ns à 458 nm, $\tau = 1,32$ ns et $\tau_M = 2,23$ ns à 488 nm) qui suggèrent que les proportions des deux durées de vie varient en fonction de la longueur d'onde d'excitation (Pepperkok et al., 1999). Pour mieux comprendre la photophysique de ce chromophore, une étude précise des déclinés associés au spectre permettrait de déterminer si les deux durées de vie sont associées à des bandes d'absorption et d'émission spécifiques. De plus, il serait intéressant de déterminer si les deux formes sont en équilibre stable et de quels paramètres dépendent leur proportion.

IV. 2. 1. 1. 3. La YFP

La figure IV. 23 présente une acquisition DL de la fluorescence de la YFP (Y pour yellow) en cellule vivante à $\lambda_{exc} = 490$ nm et $\lambda_{em} > 510$ nm.

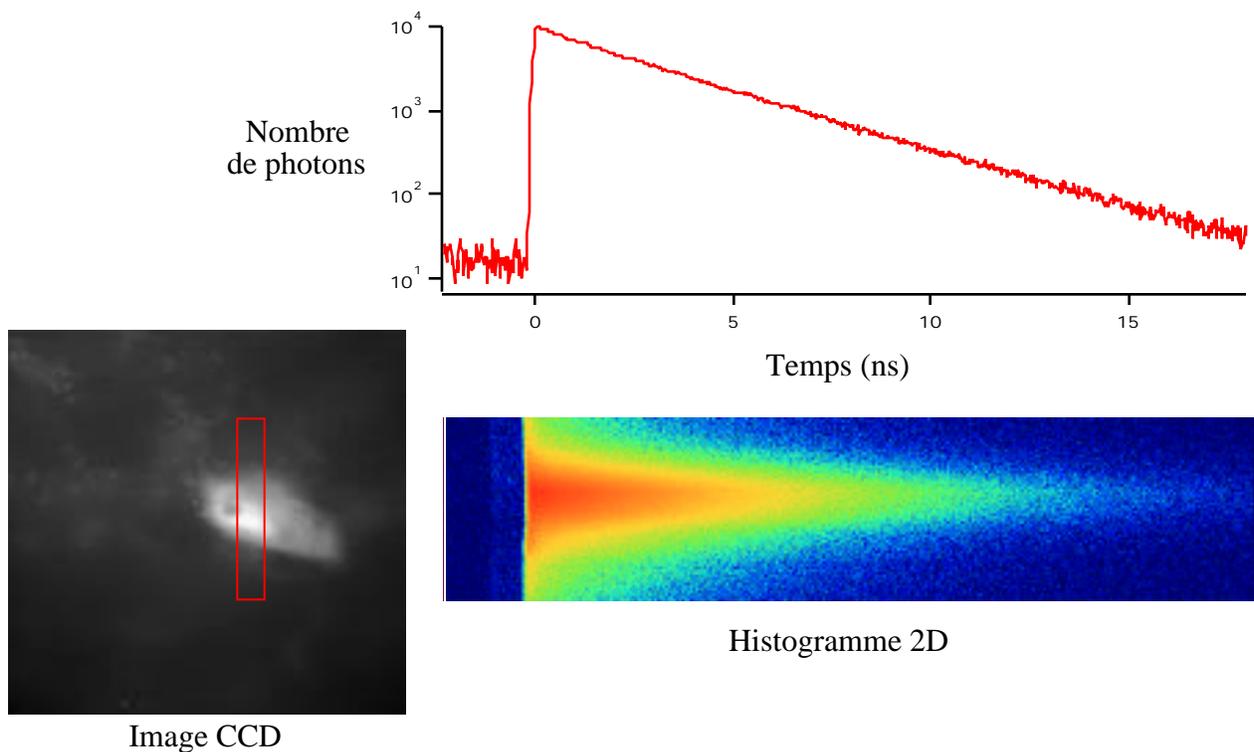


Figure IV. 23 : Acquisition DL de la YFP exprimée en cellules Vero.

Sur l'image CCD est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition a été menée avec $\lambda_{exc} = 490$ nm et $\lambda_{em} > 510$ nm et est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés. L'intégrale simple de cet histogramme en fonction de la position correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe. C'est le déclin de fluorescence total de la YFP mesuré par le DL.

L'accordabilité du laser Ti:Sa ne permet pas d'exciter la YFP à son maximum d'absorption (514 nm). La courbe expérimentale présente, en échelle logarithmique, la forme d'une droite dont l'ajustement mono-exponentiel permet de caractériser la durée de vie de la YFP qui est de 3,09 ns. L'ajustement des déclin locaux montre que la durée de vie de cette protéine ne varie pas en fonction de sa localisation sub-cellulaire.

Des études de durée de vie sur des protéines YFP en cellule et *in vitro* donnent des résultats différents (Heikal et al., 2000, Pepperkok et al., 1999). Si toutes ces études de durée de vie s'accordent sur la mono-exponentialité du déclin, des valeurs significativement différentes de durées de vie ont été trouvées. En fait, les protéines YFP utilisées dans ces études n'ont pas toutes les mêmes mutations. La table IV. 2 récapitule les divers résultats obtenus en relation avec ces mutations.

Table IV. 2 : Durées de vie des différents mutants YFP (mutations communes : S72A, T203Y).

Mutations supplémentaires				
	Technique	Contexte	Durée de vie (ns)	Référence
S65G	P&M	Cellule	= 2,85 $\tau_M = 2,88$	(Pepperkok et al., 1999)
F64L, S65T	P&M	Cellule	= 3,69 $\tau_M = 3,60$	(Pepperkok et al., 1999)
S65G, V68L, Q69A	TCSPC	Solution	= 3,60	(Heikal et al., 2000)
S65G, V68L	TCSPC	Cellule	= 3,09	Ce travail

Les deux mutations principales supposées intervenir dans les propriétés de fluorescence du chromophore (déplacement dans le rouge des spectres d'absorption et d'émission) sont T203Y et S65G ou S65T. Les autres mutations ne sont censées qu'aider et stabiliser le repliement de la protéine, excepté la mutation Q69A, l'acide aminé 69 intervenant dans l'environnement électronique du chromophore (Tsien, 1998). Ainsi les quatre mutants présentés table IV. 2 peuvent se partager en

trois groupes : (i) mutations S65G et T203Y avec une durée de vie d'environ 3 ns, (ii) mutations S65T et T203Y avec une durée de vie d'environ 3,6 ns, et (iii) mutations S65G, Q69A et T203Y avec une durée de vie de 3,6 ns. On obtient une corrélation entre la durée de vie et les différentes mutations à la position 65, 69 et 203. Ce qui rend malgré tout difficile l'interprétation de ces différents résultats, c'est qu'ils ont été obtenus sur différents systèmes expérimentaux et dans différents contextes (pour les études en solution (Heikal et al., 2000), la protéine a été exprimée en bactérie puis purifiée). Une étude des différents mutants sur un même système et dans un même contexte permettrait d'analyser plus finement les effets de ces mutations sur les durées de vie.

IV. 2. 1. 1. 4. La BFP

La figure IV. 24 présente une acquisition DL de la fluorescence de la BFP (B pour blue) en cellule vivante à $\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$ et $425 < \lambda_{em} < 495 \text{ nm}$.

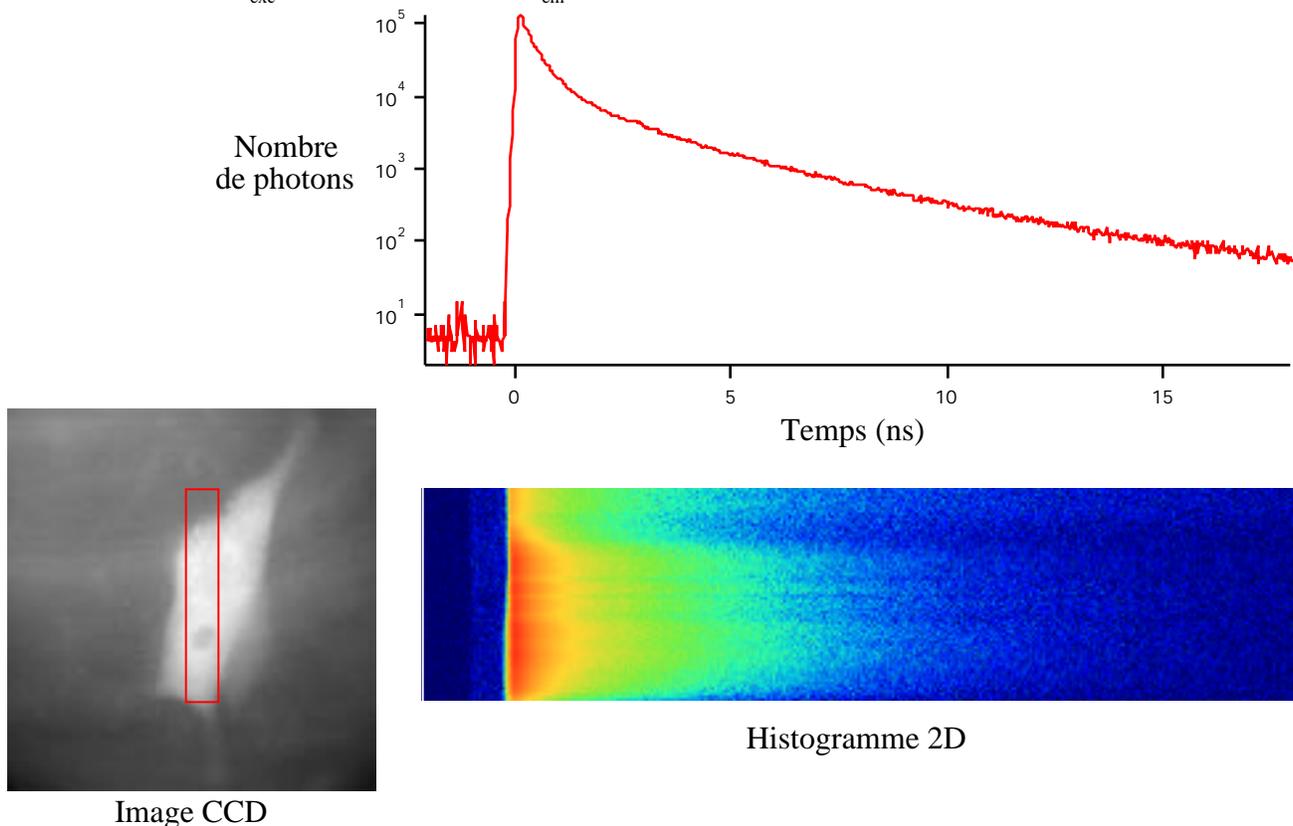


Figure IV. 24 : Acquisition DL de la BFP exprimée en cellules Vero. Sur l'image CCD est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition a été menée avec $\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$ et $425 < \lambda_{em} < 495 \text{ nm}$ et est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés. L'intégrale simple de cet histogramme en fonction de la position correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe. C'est le déclin de fluorescence total de la BFP mesuré par le DL.

L'allure de la courbe indique clairement la présence d'une durée de vie plus courte que celles caractérisées jusqu'ici. L'ajustement par un modèle bi-exponentiel donne deux durées de vie, 0,4 ns et 2,7 ns, avec comme coefficient pré-exponentiel 0,85 et 0,15, respectivement. Une étude comparative des durées de vie de l'autofluorescence dans des cellules n'exprimant pas la BFP et de la fluorescence de la BFP a été entreprise pour déterminer si les résultats présentés ici permettaient de caractériser la ou les durées de vie de la BFP. La figure IV. 25 montre les deux courbes des déclin de fluorescence de la BFP et de l'autofluorescence cellulaire.

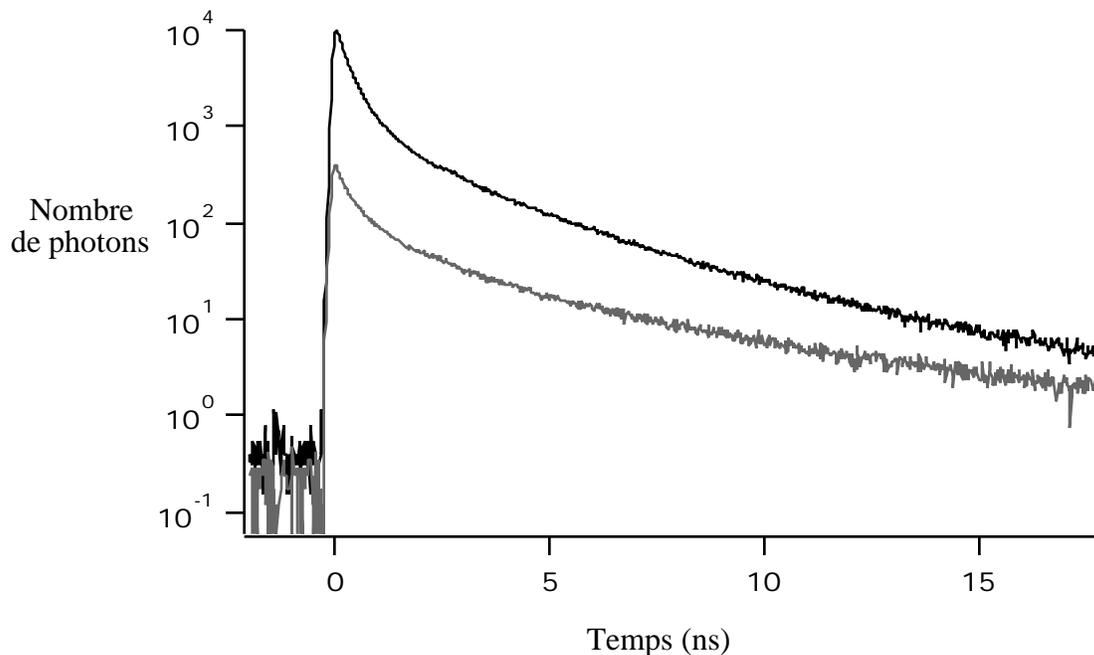


Figure IV. 25 : Comparaison du déclin de fluorescence de la BFP (noir) et du déclin de l'autofluorescence cellulaire (gris).

L'analyse de l'autofluorescence donne trois durées de vie, 0,2 ns, 0,9 ns et 4 ns avec comme coefficient préexponentiel 0,56, 0,35 et 0,1, respectivement. Au vu de ces résultats, il est donc très difficile de discriminer les différentes durées de vie mesurées et de savoir quelle est la contribution de l'autofluorescence dans le déclin de la BFP.

Le rendement quantique de la BFP n'est que de 0,24 à comparer au rendement quantique de la GFP qui est de 0,7 (Tsien, 1998). Son coefficient d'extinction molaire maximum est aussi trois fois plus faible que celui de la GFP. De plus, en cellules, lorsque l'on excite à 380 nm,

l'autofluorescence cellulaire principalement due au NADH est importante. Les propriétés de fluorescence de la BFP sont trop proches de celles de l'autofluorescence pour que l'on puisse utiliser cette protéine à faible niveau d'expression en cellules. Pour toutes ces raisons, pour les études de FRET et d'anisotropie, la BFP a été abandonnée.

IV. 2. 1. 1. 5. La DsRed

Le spectre d'absorption de la DsRed est très large, ce qui permet de l'exciter à 490 nm. La figure IV. 26 présente une acquisition DL de la fluorescence de la DsRed en cellule vivante à $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 510 \text{ nm}$.

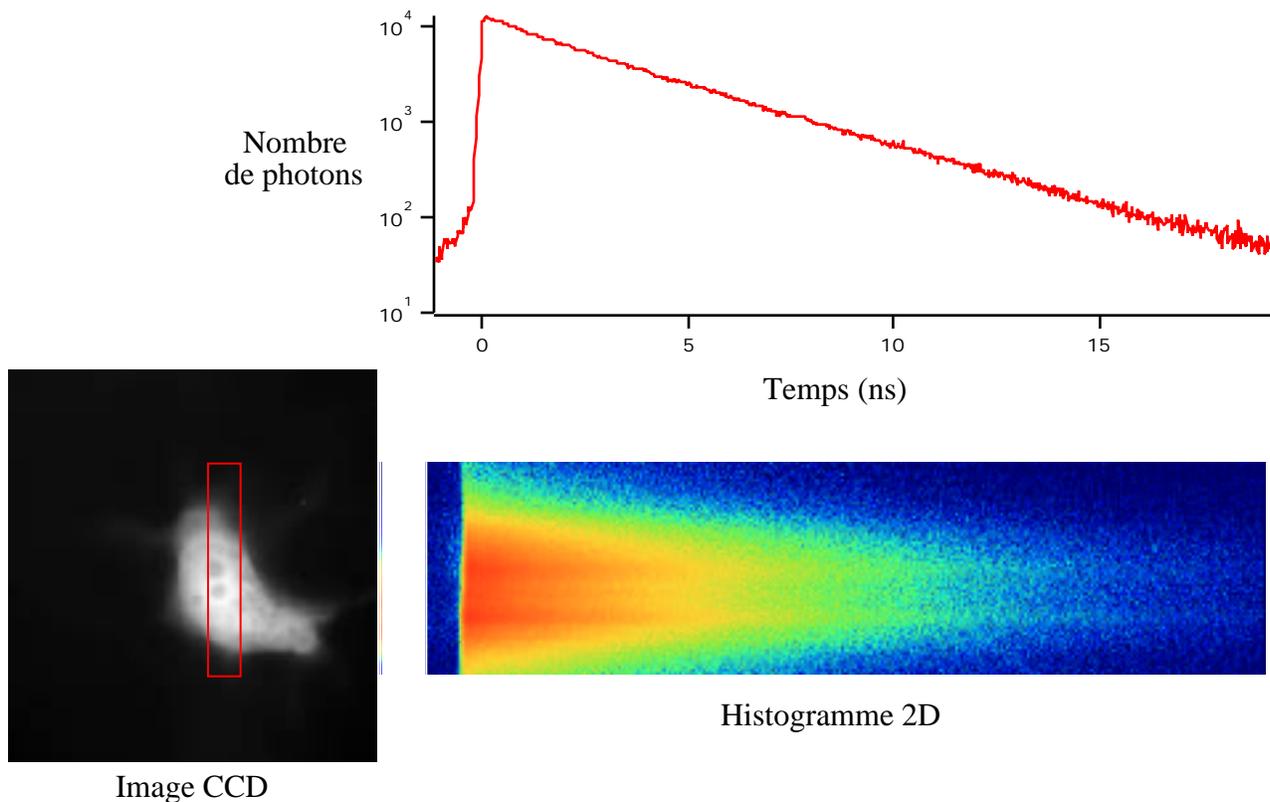


Figure IV. 26 : Acquisition DL de la DsRed exprimée en cellules Vero. Sur l'image CCD est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition a été menée avec $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 510 \text{ nm}$ et est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés. L'intégrale simple de cet histogramme en fonction de la position correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe. C'est le déclin de fluorescence total de la DsRed mesuré par le DL.

Le déclin, en échelle logarithmique, correspond à une droite. L'ajustement mono-exponentiel donne comme unique durée de vie 3,5 ns pour la DsRed. L'ajustement des déclins locaux montre que la durée de vie de cette protéine ne varie pas en fonction de sa localisation sub-cellulaire.

Différentes valeurs de durées de vie de la DsRed ont déjà été reportées dans la littérature (Heikal et al., 2000, Jakobs et al., 2000), mais jamais en cellules de mammifère. Jakobs et collaborateurs présentent des résultats en bactéries *Escherichia coli* en excitant à 950 nm par la technique du deux-photons et leurs résultats donnent des déclins mono-exponentiels avec des durées de vie variables selon les bactéries entre 3,1 ns et 1,3 ns (Jakobs et al., 2000). Dans tous les cas, la durée de vie mesurée est inférieure à celle obtenue dans nos études. Ces différences pourraient s'expliquer par : (i) la maturation des protéines, différente en cellule et en bactérie, et (ii) l'excitation bi-photonique. Pour ce que l'on peut supposer de la photophysique de la DsRed et de sa lente maturation d'une espèce verte vers l'espèce qui fluoresce dans le rouge (Baird et al., 2000, Gross et al., 2000), il semble être encore un peu tôt pour expliquer ce résultat. D'autres études en solution sont plus conformes à nos résultats (Heikal et al., 2000), rapportant une durée de vie de 3,65 ns. En l'état actuel des choses, il serait intéressant de caractériser en cellules s'il existe une espèce verte de cette protéine, et si cette espèce (bien qu'elle ait été décrite comme très faiblement fluorescente (Gross et al., 2000)) peut être handicapante dans les études de FRET. De plus, la protéine a été décrite comme formant des tétramères (Baird et al., 2000, Jakobs et al., 2000, Wall et al., 2000). Des contrôles dans les expériences de FRET utilisant la DsRed s'avèrent donc indispensables (voir Ch. V. 1). Il est probable qu'à l'avenir, différents mutants améliorant la maturation et la solubilité de cette protéine seront proposés.

En résumé, la figure IV. 27 présente un comparatif des différents déclins mesurés qui sont bien corrélés avec les durées de vie récapitulées dans la table IV. 3.

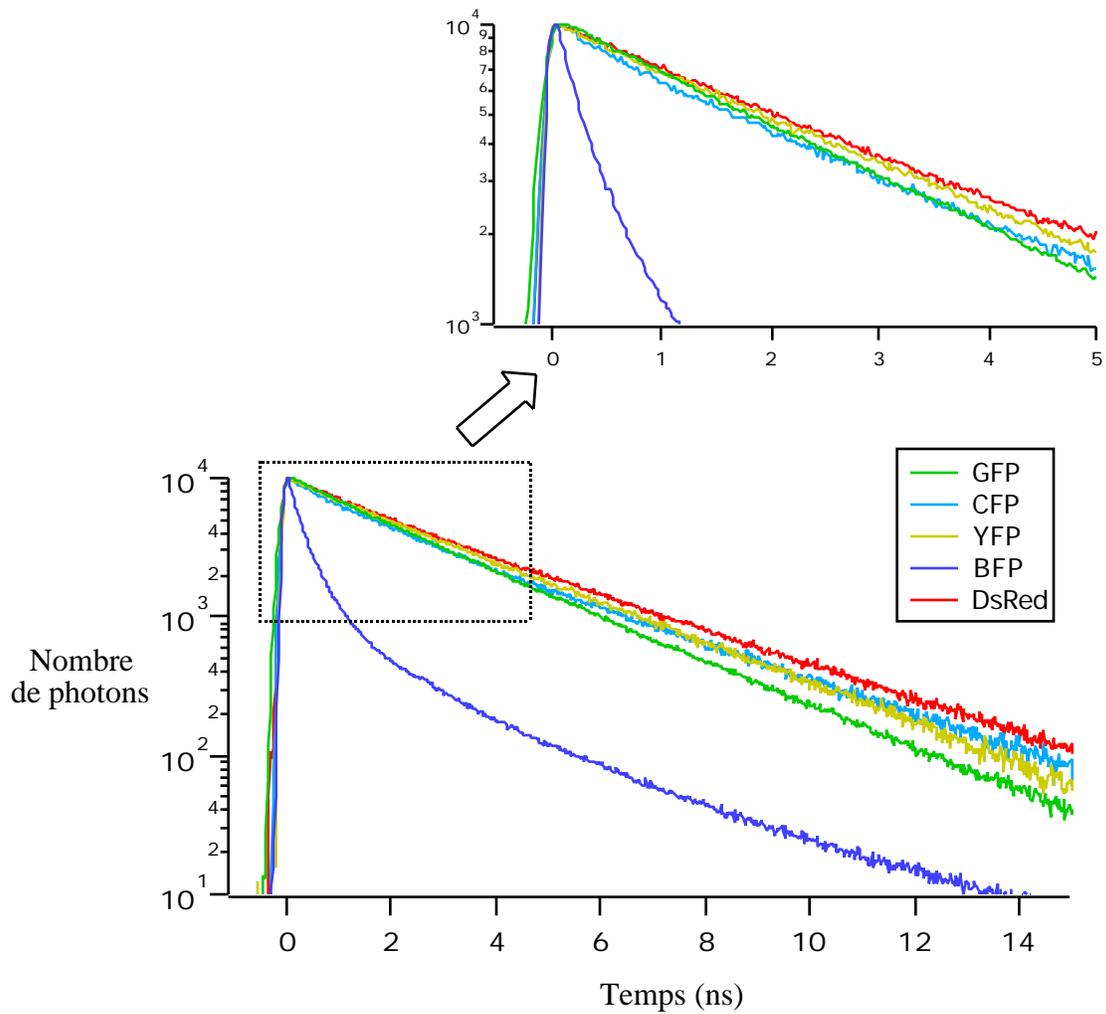


Figure IV. 27 : Comparaison des différents déclin de fluorescence des protéines autofluorescentes. La figure du haut présente un agrandissement du cadre pointillé de la figure principale. Tous les déclin proviennent des acquisitions DL et ont été normalisés à 10000 coups au maximum. La position relative de ces déclin aux temps courts et aux temps longs correspond bien qualitativement aux résultats présentés table IV. 3.

Table IV. 3 : Durées de vie des différentes XFP.

Protéine	τ_1 (ns)	a_1	τ_2 (ns)	a_2
EGFP	2,6	1		
ECFP	3,4	0,6	1,3	0,4
EYFP	3,1	1		
EBFP	2,7	0,15	0,4	0,85
DsRed	3,5	1		

IV. 2. 1. 2. Déclins de fluorescence de la GFP fusionnée à différentes protéines d'intérêt

Une étude précise des durées de vie de la GFP et de plusieurs de ses protéines fusion a été entreprise pour caractériser plus finement des variations éventuelles. Pour ces mesures, la correction des effets de polarisation sur le déclin de fluorescence, peu importants et négligeables en première approximation, a été nécessaire. Cela consiste à recueillir l'émission de fluorescence à travers un analyseur positionné à $54,7^\circ$ de la direction de polarisation du laser, source d'excitation. Dans cette géométrie, la fluorescence recueillie correspond à $I_{\text{par}} + 2 I_{\text{per}}$, somme indépendante des effets de polarisation (voir Ch. II. 3. 2).

IV. 2. 1. 2. 1. Durées de vie de la GFP en fonction du temps après transfection

Les mesures, effectuées à J_1 , J_2 ou J_3 après la transfection, ont toutes été analysées selon un modèle mono-exponentiel et un modèle bi-exponentiel. Les résultats de ces ajustements sont présentés table IV. 4. A J_1 et pour deux mesures sur cinq à J_2 , les χ^2 , critères de minimisation de l'ajustement, ne sont pas améliorés par le modèle bi-exponentiel, ce qui confirme la nature mono-exponentielle du déclin de la GFP. Par contre, pour les autres mesures à J_2 et pour toutes les mesures à J_3 , les χ^2 obtenus par le modèle bi-exponentiel sont légèrement meilleurs. Ces résultats pourraient suggérer l'apparition d'une seconde durée de vie de ~ 2 ns avec une contribution de $\sim 0,20$. Ces déclins ont aussi été analysés en utilisant une distribution gaussienne de durée de vie. Le modèle est, dans ce cas, décrit par la valeur au maximum de la distribution et la largeur de la distribution. Pour ce modèle, les χ^2 obtenus sont équivalents aux χ^2 obtenus précédemment par les modèles discrets. Ainsi, pour les déclins trouvés mono-exponentiels, la largeur de la distribution est nulle, pour les déclins trouvés bi-exponentiels, la largeur de la distribution est entre 0,2 ns et 0,4 ns. Cette dernière analyse suggère qu'au lieu de l'apparition d'une seconde durée de vie, c'est une distribution de durée de vie autour de la durée de vie initiale (celle mesurée à J_1) qui apparaîtrait deux ou trois jours après transfection.

Table IV. 4 : Durées de vie de la GFP en fonction du temps après transfection.

transfection	1	2	1	a ₁	2	a ₂	2
Jour après	(ns)	2	(ns)		(ns)		2
J ₁	2,70	5,478	2,86	0,55	2,49	0,45	5,474
J ₁	2,81	7,885	2,81	-	2,79	-	7,901
J ₁	2,76	2,192	2,78	0,98	1,29	0,02	2,188
J ₁	2,75	2,288	2,76	-	2,74	-	2,297
J ₂	2,79	2,666	2,79	-	2,79	-	2,671
J ₂	2,78	2,301	2,78	-	2,76	-	2,305
J ₂	2,69	4,551	2,81	0,80	1,94	0,20	4,458
J ₂	2,69	6,941	2,78	0,86	1,94	0,14	6,680
J ₂	2,75	2,160	3,00	0,66	2,15	0,34	1,991
J ₃	2,69	1,786	2,81	0,81	2,05	0,19	1,721
J ₃	2,67	2,544	2,82	0,73	2,18	0,27	2,481
J ₃	2,64	2,981	2,83	0,70	2,08	0,30	2,783

IV. 2. 1. 2. 2. Durées de vie des protéines fusion GFP

Les résultats des ajustements des mesures effectuées sur les différentes protéines fusion, GFP-TK (Thymidine kinase du virus de l'herpès *simplex* type I), TK-GFP, GFP-EBNA (Epstein Bar Nuclear Antigen), LNA-GFP (Latency Nuclear Antigen du virus herpès humain 8), sont présentés table IV. 5. Dans ce cas, quel que soit le temps après transfection, et pour toutes les protéines fusion en C ou en N-terminal, le modèle bi-exponentiel donne de bien meilleurs ². La moyenne de ces ajustements donne $\tau_1 = 3,05 \pm 0,23$ ns et $\tau_2 = 1,80 \pm 0,21$ ns avec $a_1 = 0,73 \pm 0,07$ et $a_2 = 0,27 \pm 0,07$ (n = 13, SD).

Table IV. 5 : Durées de vie des protéines fusions GFP.

Protéine fusion	Jour après transfection			1		2		
		(ns)	²	(ns)	a ₁	(ns)	a ₂	²
GFP-TK	J ₁	2,70	2,688	2,82	0,87	1,35	0,13	1,964
GFP-TK	J ₁	2,82	1,891	3,04	0,78	1,70	0,22	1,460
GFP-TK	J ₁	2,82	3,281	3,01	0,81	1,51	0,19	2,081
GFP-TK	J ₃	3,18	6,561	3,60	0,68	1,89	0,32	2,211
GFP-TK	J ₃	2,98	3,228	3,42	0,62	2,00	0,38	2,035
TK-GFP	J ₂	2,67	2,959	2,92	0,67	2,06	0,33	2,806
TK-GFP	J ₂	2,87	7,632	3,15	0,72	1,84	0,28	6,546
TK-GFP	J ₂	2,71	3,088	2,89	0,75	2,04	0,25	2,814
GFP-EBNA	J ₁	2,75	2,135	3,14	0,65	1,74	0,35	1,371
GFP-EBNA	J ₁	2,67	1,835	2,90	0,74	1,60	0,26	1,116
GFP-EBNA	J ₁	2,72	1,457	2,94	0,73	1,93	0,27	1,138
LANA-GFP	J ₁	2,63	1,943	2,81	0,74	1,93	0,26	1,498
LANA-GFP	J ₁	2,75	3,293	3,01	0,71	1,84	0,29	2,477

De la même manière que pour les mesures de la GFP seule, un ajustement par une distribution gaussienne a aussi été effectuée. Dans tous les cas, le ² de ces analyses est quasi-identique à celui du modèle bi-exponentiel, et la largeur des distributions va de 0,39 à 0,84 ns. Il est donc bien difficile de trancher entre le modèle discret et le modèle utilisant une distribution. Il serait envisageable d'utiliser la méthode du maximum d'entropie (Brochon, 1994) pour tenter de trancher entre ces deux modèles, cette méthode ne modélisant pas a priori des durées de vie discrètes ou une distribution.

IV. 2. 1. 2. 3. Discussion

En première approximation, la GFP utilisée dans nos études est majoritairement mono-exponentielle avec une durée de vie de 2,6 ns. En analysant finement les déclin de la GFP en fonction du temps post-transfection ou lorsqu'elle est fusionnée à une autre protéine, il apparaît une cinétique plus complexe. L'apparition d'une durée de vie plus courte signifie l'existence de processus de désexcitation non radiatifs du chromophore. Sachant qu'il n'y a pas de possibilité évidente de couplage dipolaire à longue portée (FRET) et que la protéine protège le fluorophore des autres mécanismes de désexcitation non radiatifs, une durée de vie plus courte peut s'expliquer par une déstabilisation de conformation tri-dimensionnelle de la protéine en permettant au solvant d'accéder plus facilement au chromophore.

Un travail récent sur la GFP utilisant la méthode TCSPC présente aussi des résultats avec un modèle multi-exponentiel (Hink et al., 2000). En analysant les mesures effectuées par phase et modulation en cellules vivantes par R. Pepperkok et collaborateurs pour les protéines autofluorescentes seules ou fusionnées, on remarque aussi une dispersion des durées de vie de la GFP après fusion à l'ErbB1 et au p110 puisque les valeurs de τ et τ_M ne sont pas équivalentes (Pepperkok et al., 1999). Pour la GFP seule, ils trouvent $\tau = 2,36$ ns et $\tau_M = 2,42$ ns alors que pour les protéines fusion, ils trouvent $\tau = 2,11$ ns et $\tau_M = 2,43$ ns ainsi que $\tau = 2,13$ ns et $\tau_M = 2,44$ ns, respectivement pour l'ErbB1 et le p110.

Si on prend le cas du modèle de distribution, il est plus aisé de proposer une explication biologique aux variations des durées de vie de fluorescence de la GFP dans le temps, seule ou fusionnée. En effet, les résultats moyens de ces analyses avec une distribution gaussienne donnent $2,71 \pm 0,06$ ns et une largeur de $0,21 \pm 0,16$ ns ($n = 14$, SD) pour la GFP seule et $2,72 \pm 0,13$ ns et une largeur de $0,55 \pm 0,14$ ns ($n = 13$, SD) pour les protéines fusion GFP. A l'état de base, seule en cellule vivante, la GFP aurait une durée de vie discrète traduisant une population très homogène due au fait d'une grande stabilité de structure tertiaire de la protéine. Cette structure tertiaire serait susceptible de légèrement se déstabiliser en fonction du temps après transfection ou par fusion à une autre protéine. Cette déstabilisation induirait différentes durées de vie qui se distribueraient plus

ou moins largement autour de sa valeur initiale. Aussi, compte tenu de la faible largeur de cette distribution Gaussienne, modéliser les durées de vie de la GFP fusionnée ou non selon un modèle discret mono-exponentiel est une approximation valable. C'est ce que nous avons effectué dans les expériences de FRET et d'anisotropie utilisant la GFP.

IV. 2. 1. 3. Couples de FRET et R_0

Par la technique des déclin, mesurer le FRET correspond à mesurer la durée de vie du donneur en présence de l'accepteur. La contrainte consiste à utiliser des blocs dichroïques qui sélectionnent à l'émission la fluorescence du donneur. Compte tenu de la forme des spectres d'émission, cette sélection s'opère facilement, à la différence de la sélection de la fluorescence de l'accepteur, où il est difficile de couper complètement la contribution du donneur (voir Ch. II. 2. 4. 1). Pour chaque couple, le R_0 (Eq. II. 2. 8) a été caractérisé pour interpréter en terme de distance la vitesse de transfert mesurée.

IV. 2. 1. 3. 1. Couple BFP / GFP

La figure IV. 28 présente les spectres d'absorption et d'émission de la BFP et de la GFP. Le recouvrement de l'émission de la BFP avec l'absorption de la GFP en fait un couple potentiel pour des études de FRET. Sont également représentées l'excitation par le laser et la sélection à l'émission de la fluorescence de la BFP correspondant aux propriétés spectrales du bloc dichroïque utilisé.

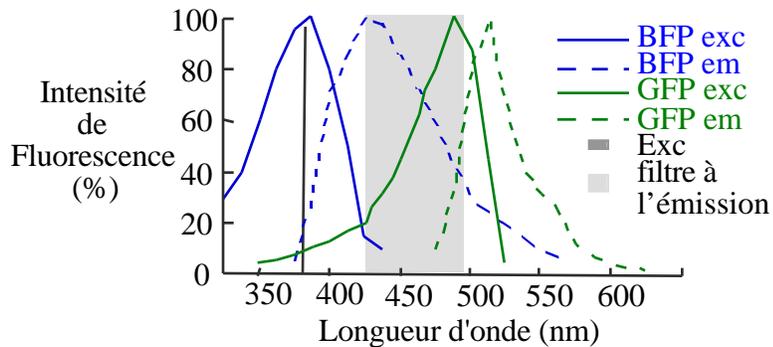


Figure IV. 28 : Couple de FRET BFP / GFP.

Les spectres d'absorption et d'émission de la BFP et de la GFP sont présentés avec la longueur d'onde d'excitation du laser (380 nm) et le filtre à l'émission (entre 425 et 495 nm) utilisé pour sélectionner la fluorescence de la BFP.

Malheureusement, comme présenté chapitre IV. 2. 1. 1. 4, les propriétés de fluorescence de la BFP en regard avec l'autofluorescence cellulaire ne permettent pas d'utiliser facilement ce couple pour le FRET en cellule vivante.

IV. 2. 1. 3. 2. Couple CFP / YFP

La figure IV. 29 présente les spectres d'absorption et d'émission de la CFP et de la YFP. Le recouvrement de l'émission de la CFP avec l'absorption de la YFP en fait un couple potentiel pour des études de FRET. Sont également représentées l'excitation par le laser et la sélection à l'émission de la fluorescence de la CFP correspondant aux propriétés spectrales du bloc dichroïque utilisé.

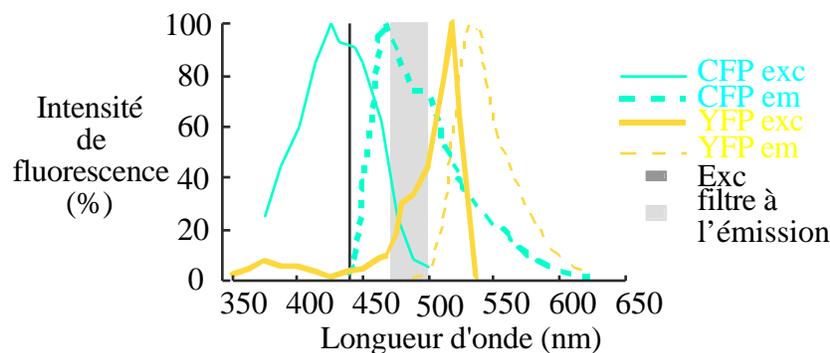


Figure IV. 29 : Couple de FRET CFP / YFP.

Les spectres d'absorption et d'émission de la CFP et de la YFP sont présentés avec la longueur d'onde d'excitation du laser (440 nm) et le filtre à l'émission (entre 470 et 500 nm) utilisé pour sélectionner la fluorescence de la CFP.

La caractérisation du R_0 de ce couple a déjà été effectuée dans la littérature (Heim, 1999), et $R_0 = 52 \text{ \AA}$.

IV. 2. 1. 3. 3. Couple GFP / DsRed

La figure IV. 30 présente les spectres d'absorption et d'émission de la GFP et de la DsRed. Le recouvrement de l'émission de la GFP avec l'absorption de la DsRed en fait un couple potentiel pour des études de FRET. Sont également représentées l'excitation par le laser et la sélection à l'émission de la fluorescence de la GFP correspondant aux propriétés spectrales du bloc dichroïque utilisé. Si, compte tenu de la forme du spectre d'absorption de la DsRed, il n'est pas possible

d'exciter sélectivement la GFP, le filtre interférentiel à l'émission sélectionne uniquement les photons de fluorescence de la GFP.

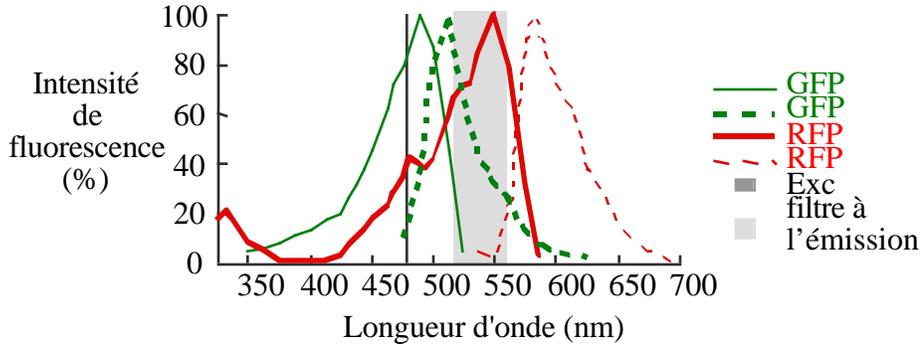


Figure IV. 30 : Couple de FRET GFP / DsRed.

Les spectres d'absorption et d'émission de la GFP et de la DsRed sont présentés avec la longueur d'onde d'excitation du laser (480 nm) et le filtre à l'émission (entre 515 et 560 nm) utilisé pour sélectionner la fluorescence de la GFP.

Le R_0 a été caractérisé à partir de l'équation II. 2. 8. J a été calculé selon l'équation II. 2. 5 correspondant au recouvrement présenté figure IV. 31 avec $\epsilon_{\text{Max}}(\text{DsRed}) = 22500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Clontech). On trouve $J = 8,974 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$. En prenant le rendement quantique de la EGFP, $Q_D = 0,66$ (Clontech), l'indice de réfraction du milieu, $n = 1,33$ pour les protéines [Selvin, 1995 #213], et le facteur d'orientation, $\kappa^2 = 2/3$ correspondant à une orientation aléatoire, on détermine $R_0 = 47 \text{ \AA}$.

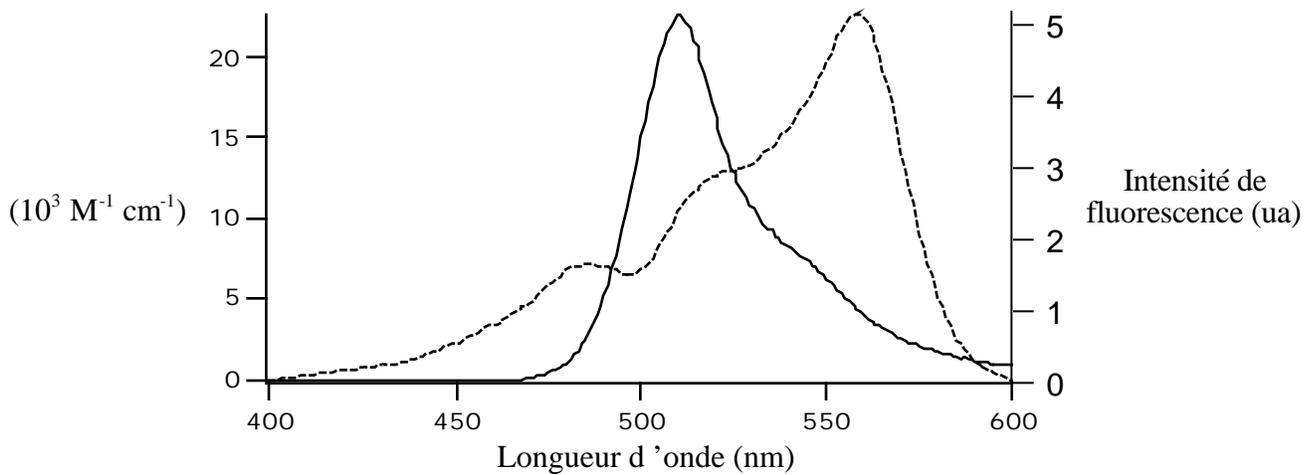


Figure IV. 31 : Recouvrement spectral du couple GFP / DsRed.

Le spectre d'émission de la GFP donneuse (continu) et le spectre d'absorption de la DsRed acceptrice (pointillé) présentent un recouvrement. La quantification de ce recouvrement est nécessaire au calcul de la distance de Förster. Le spectre d'émission de la GFP a été obtenu au laboratoire, le spectre d'absorption de la DsRed provient de Clontech.

IV. 2. 1. 3. 4. HomoFRET GFP

Pour deux chromophores identiques, il peut y avoir un transfert d'énergie de type Förster. Dans ce cas, la durée de vie ne varie pas, mais on peut détecter cet homoFRET par anisotropie (Ch. II. 3. 4). Pour modéliser les études de déclin d'anisotropie par homoFRET entre GFP, la caractérisation du R_0 est nécessaire. De la même manière que pour les couples de FRET, le R_0 est caractéristique du recouvrement des spectres d'absorption et d'émission (Fig. IV. 32).

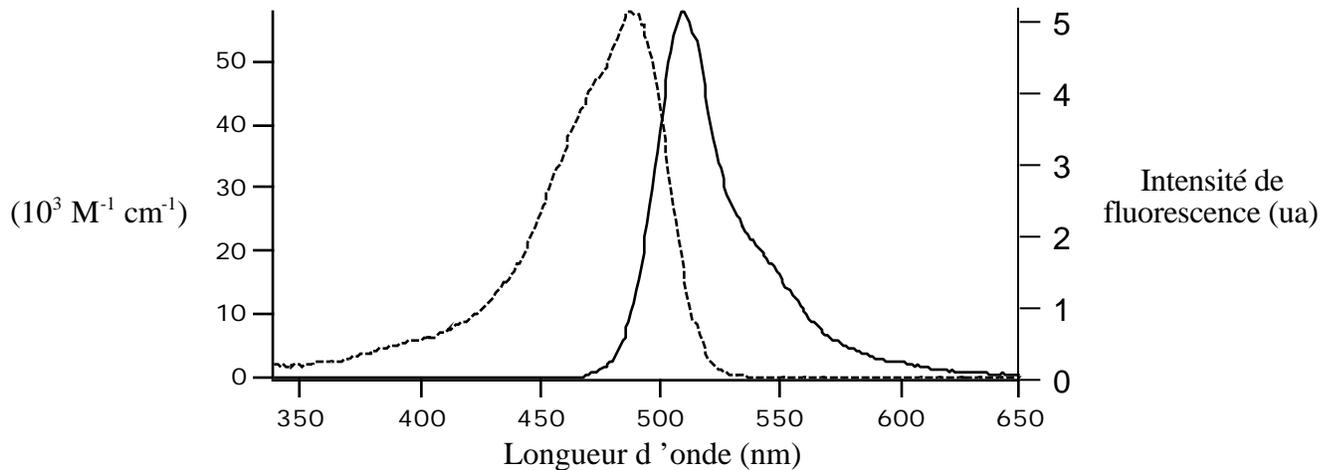


Figure IV. 32 : Recouvrement spectral du couple GFP / GFP.

Le spectre d'absorption et d'émission de la GFP présente un recouvrement. La quantification de ce recouvrement est nécessaire au calcul de la distance de Förster pour l'homoFRET entre GFP. Le spectre d'émission de la GFP a été obtenu au laboratoire, le spectre d'absorption, également obtenu au laboratoire, a été normalisé à $58000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ au maximum (Clontech).

On a $J = 9,361 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ avec $J_{\text{max}}(\text{EGFP}) = 58000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Clontech). En prenant le rendement quantique de la EGFP, $Q_D = 0,66$ (Clontech), l'indice de réfraction du milieu, $n = 1,33$ pour les protéines (Selvin, 1995), et le facteur d'orientation, $\kappa^2 = 2/3$ correspondant à une orientation aléatoire, on détermine $R_0 = 47 \text{ \AA}$.

IV. 2. 1. 4. Déclins d'anisotropie de la GFP seule en solution et en cellule

Pour étudier les déclins d'anisotropie des protéines fusion, caractéristiques de la diffusion rotationnelle ou de l'homoFRET, des mesures préliminaires pour la protéine GFP seule ont été effectuées en solution et en cellule vivante. Ces expériences ont été effectuées sur le système confocal présenté chapitre III. 2. 1. Les résultats des ajustements par le modèle de diffusion

rotationnelle d'une sphère (Eq. II. 3. 16 et II. 3. 17) sont présentés table IV. 6 (voir aussi pour la méthode des ajustements le chapitre III. 3 et particulièrement les équations III. 3. 5 et III. 3. 6).

Table IV. 6 : Paramètres des déclin d'anisotropie de la GFP.

Contexte	ON	(ns)	r_0	(ns)
Solution	0,8	2,69	0,32	10,5 (8,9 - 12,4)
Cytoplasme	1,3	2,61	0,26	19,3 (17,2 – 21,8)
Cytoplasme	1,3	2,56	0,26	25,2 (22,1 – 28,8)
Noyau	1,3	2,58	0,27	23,4 (20,7 – 27,2)
Noyau	1,3	2,57	0,27	24,3 (21,5 – 28,6)

Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'intervalle issu du critère de confiance de l'ajustement.

La figure IV. 33 montre les courbes expérimentales caractéristiques de déclin d'anisotropie pour la GFP en solution et la GFP en cellules vivantes.

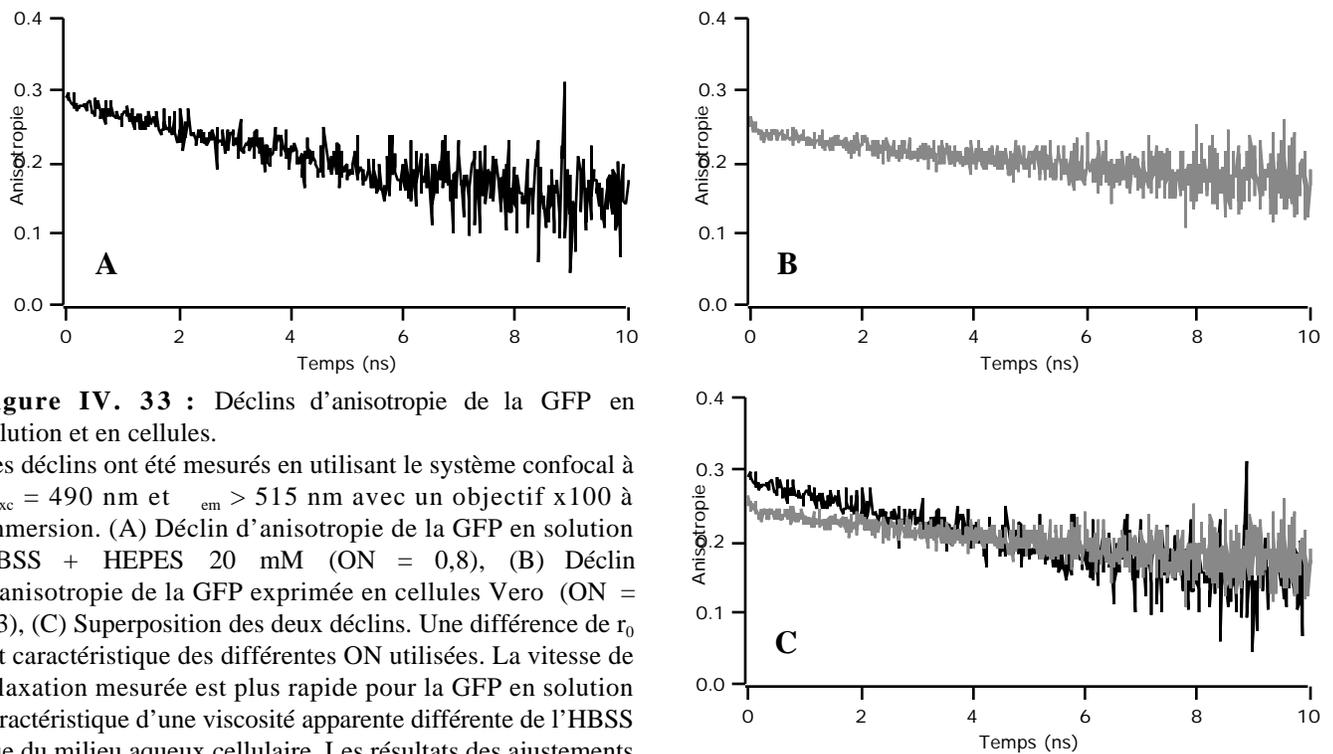


Figure IV. 33 : Déclins d'anisotropie de la GFP en solution et en cellules.

Les déclin ont été mesurés en utilisant le système confocal à $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 515 \text{ nm}$ avec un objectif x100 à immersion. (A) Déclin d'anisotropie de la GFP en solution HBSS + HEPES 20 mM (ON = 0,8), (B) Déclin d'anisotropie de la GFP exprimée en cellules Vero (ON = 1,3), (C) Superposition des deux déclin. Une différence de r_0 est caractéristique des différentes ON utilisées. La vitesse de relaxation mesurée est plus rapide pour la GFP en solution caractéristique d'une viscosité apparente différente de l'HBSS que du milieu aqueux cellulaire. Les résultats des ajustements sont présentés table IV. 6.

En premier lieu, les durées de vie déterminées par l'ajustement de ces déclin d'anisotropie sont caractéristiques de la durée de vie de la GFP présentée chapitre IV. 2. 1. 1. 1. Les valeurs de r_0 et la variation par rapport à l'ON présentées dans la table sont identiques aux valeurs mesurées pour la Rd 6G (Ch. IV. 1. 2. 3). On peut aussi observer la différence de r_0 à 0,8 et 1,3 d'ON sur les deux courbes d'anisotropie superposées figure IV. 33. Ces résultats indiquent que le dipôle d'absorption et le dipôle d'émission du chromophore GFP sont parallèles (comme pour la rhodamine) et que la valeur théorique du r_0 (sans effet de l'ouverture numérique) correspond à 0,4, valeur expérimentalement mesurée en cuve (Heikal et al., 2000, Hink et al., 2000, Volkmer et al., 2000). Le bon ajustement par un modèle monoexponentiel suggère aussi que le tonneau caractéristique de la GFP de 24 Å de diamètre sur 48 Å de hauteur peut être considéré comme une sphère, en accord avec d'autres travaux récents (Heikal et al., 2000, Hink et al., 2000, Swaminathan et al., 1997, Volkmer et al., 2000). De plus, ces différents résultats indiquent qu'il n'y a pas de mouvements locaux du chromophore à l'intérieur du tonneau et qu'il se trouve rigidement fixé au reste de la protéine.

En transformant l'équation II. 3. 17, on peut mesurer R_h , le rayon hydrodynamique de la GFP, par :

$$R_h = (3 \tau k T / 4 \eta)^{1/3} \quad (\text{IV. 2. 2})$$

La valeur de temps de corrélation de 10,5 ns en solution (PBS), sachant que la viscosité est de 1 cp, donne $R_h = 21,9 \text{ \AA}$. Cette valeur est compatible avec les dimensions du tonneau de la structure cristalline, mais aussi identique au calcul de la mesure du rayon de la sphère hydratée constituée d'une protéine de 27kDa (masse molaire de la GFP) qui est de 22 Å (en prenant 1 cm³ / g comme volume hydraté pour une protéine (Cantor & Schimmel, 1980)). En cellule, dans le cytoplasme ou dans le noyau, les valeurs sont comparables et la moyenne est de 23,1 ± 2,6 ns. Par comparaison avec la valeur obtenue en solution, on peut caractériser la microviscosité du milieu cellulaire qui correspond à 2,2 cp. On parle ici de microviscosité caractérisant l'environnement aqueux de la GFP. Le milieu cellulaire est hétérogène et composé de nombreuses macromolécules. Dans ce cas, les hypothèses de milieu continu et homogène de la loi de Stokes-Einstein ne sont plus vérifiées

(Lavalette et al., 1999). La valeur de 2,2 cp est donc dépendante du volume de la sonde utilisée pour caractériser la viscosité et ne correspond pas à une grandeur physique indépendante du mode opératoire. Dans le travail de R. Swaminathan et collaborateurs, les résultats de la GFP en solution et en cellule par phase et modulation sont de 20 ns et 36 ns, respectivement (Swaminathan et al., 1997). Ces mesures sont assez proches de nos résultats mesurés sur le système confocal.

Concernant le temps de corrélation de la GFP en solution, la table IV. 7 compare les valeurs de la littérature et celle correspondant à ce travail. Les valeurs sont toutes assez comparables, compte tenu des différentes instrumentations et protéines utilisées.

Table IV. 7 : Comparaison des temps de corrélation d'anisotropie de la GFP en solution.

Protéine	Méthode	(ns)	Référence
GFP-S65T	P & M	20	[Swaminathan, 1997 #201]
EGFP	TCSPC	10,6	[Hink, 2000 #202]
GFP-S65T	TCSPC	16	[Volkmer, 2000 #154]
YFP (Citrine)	TCSPC	16	[Heikal, 2000 #142]
EGFP	TCSPC	10,5	ce travail

IV. 2. 2. L'éthidium

Le bromure d'éthidium est couramment utilisé en biochimie pour marquer les acides nucléiques et particulièrement l'ADN, par exemple pour visualiser les acides nucléiques sur gel. Cette technique repose sur l'augmentation de l'intensité de fluorescence de l'éthidium lorsqu'il est lié à l'ADN par rapport à l'éthidium libre en solution. Dans ce travail, ces propriétés de fluorescence ont été utilisées pour sonder l'ADN nucléaire en cellule vivante. Pour bien caractériser les propriétés de ce marquage, des études expérimentales en solution ont été menées sur les durées de vie de l'éthidium en absence et en présence d'ADN. De plus, un travail sous la responsabilité de D. Jameson (Université d'Hawaii) sur l'interaction éthidium-ARNt^{phe} m'a permis de bien maîtriser

les différentes propriétés de cette sonde déjà beaucoup étudiée et utilisée mais encore toujours très surprenante. L'acquis de ces différents travaux *in vitro* a permis de mieux maîtriser et étudier les propriétés de fluorescence de l'éthidium en cellules vivantes.

IV. 2. 2. 1. Durées de vie de l'éthidium

L'éthidium s'intercale entre les paires de bases de la double hélice d'ADN. Olmsted et Kearns ont étudié le mécanisme de l'augmentation de l'intensité de fluorescence lorsque l'éthidium s'intercale dans les acides nucléiques (Olmsted III & Kearns, 1977). D'après leurs travaux, cette augmentation de fluorescence serait directement attribuée à la réduction de la vitesse de transfert de proton de l'éthidium à l'état excité vers le solvant. L'intercalation de l'éthidium protégerait le chromophore des propriétés d'extinction du solvant correspondant à l'augmentation de la durée de vie de l'éthidium intercalé. Cette unique interprétation est encore aujourd'hui la plus probable même si on ne peut exclure un autre mécanisme impliqué dans cette augmentation. En effet, deux éléments seraient susceptibles de contester cette hypothèse : (i) le spectre d'absorption varie pour la forme libre (maximum à 480 nm) et la forme intercalée (maximum à 525 nm), et (ii) dans des études préliminaires de titration du marquage de l'ARN de transfert par l'éthidium, l'augmentation de l'intensité n'est pas proportionnelle à l'augmentation de la durée de vie. Ces deux éléments suggèrent que la nature même du chromophore change par intercalation. Des études plus précises de photophysique, et notamment en utilisant l'appareillage récent de spectroscopie de fluorescence, permettraient certainement d'apporter de nouveaux éléments capables d'éclairer ce mécanisme.

Des mesures de durées de vie de l'éthidium en solution en absence et en présence d'ADN linéaire (ADN de phage λ) ont été menées à l'aide du système confocal en excitant à 498 nm. La figure IV. 34 présente ces déclin de fluorescence. Les durées de vie mesurées, 1,8 ns pour l'éthidium libre, 22 ns pour l'éthidium intercalé, correspondent aux durées de vie caractéristiques des deux formes de l'éthidium largement rapportées dans la littérature depuis une trentaine d'années.

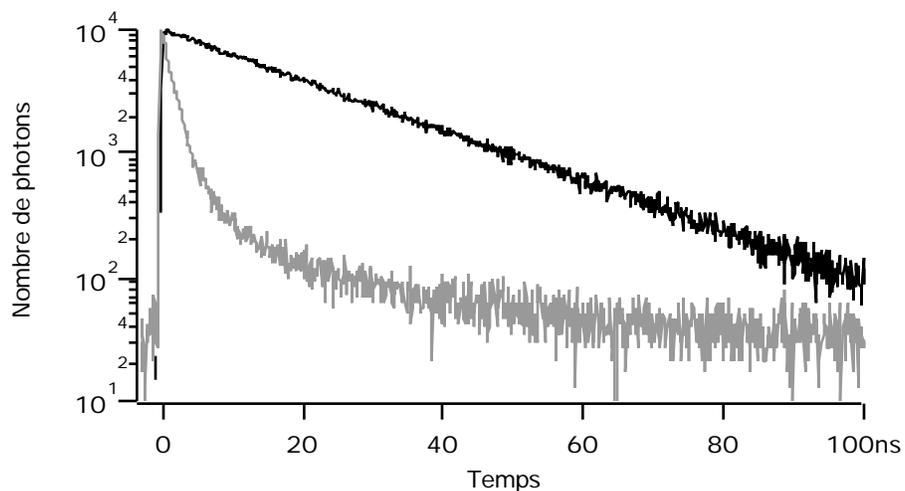


Figure IV. 34 : Déclins de fluorescence de l'éthidium en solution seul ou en présence d'ADN. Les solutions dans l'eau de bromure d'éthidium en absence (gris) et en présence (noir) d'ADN de phage ϕ présentent des cinétiques de fluorescence très différentes. Les résultats des ajustements sont de 1,7 ns pour l'éthidium seul et 22 ns pour l'éthidium en présence d'ADN caractéristique de l'intercalation du cation éthidium entre les paires de base de l'ADN.

IV. 2. 2. 2. Un exemple in-vitro : interaction éthidium-ARN t^{phe}

Le travail présenté ici a été effectué successivement au laboratoire de D. Jameson (Université d'Hawaii) et au Laboratory for Fluorescence Dynamics d'E. Gratton (Université de l'Illinois) sous la responsabilité de D. Jameson pendant un séjour de deux mois aux USA. De nombreux travaux sur l'interaction entre le bromure d'éthidium et l'ARN de transfert ont été menés depuis plus de trente ans. Ces études ont montré l'existence (i) d'un site principal d'interaction de l'éthidium avec l'ARN de transfert caractérisé par une durée de vie de fluorescence de l'éthidium de 26 ns, et (ii) d'un ou plusieurs sites secondaires caractérisés par une durée de vie moins longue (Ehrenberg et al., 1979, Hazlett et al., 1989, Thomas et al., 1984). Cependant, l'association des différentes durées de vie de fluorescence de l'éthidium aux modes d'interaction de ce cation avec l'ARN de transfert n'est pas bien élucidée. Afin de mieux caractériser de façon spectroscopique et biochimique l'interaction de l'éthidium avec l'ARN de transfert, nous avons entrepris un travail sur les interactions de l'éthidium avec le ARN t^{phe} en faisant varier le rapport de concentration éthidium/ARN t , et dans différentes conditions de solvant à l'aide de la technique de phase et modulation à multiples fréquences et de l'analyse globale des données.

Le système expérimental est présenté en détail ailleurs (Gratton & Limkeman, 1983). Les acquisitions sur le fluoromètre ISS K2 (Urbana, USA) ont été effectuées sur une fenêtre de

fréquence entre 0,8 MHz et 80 MHz. Les mesures ont été effectuées à sept différents rapports de concentration éthidium/ARNt de 0,25 à 4. Les courbes expérimentales de déphasage et de démodulation en fonction de la fréquence d'excitation sont présentées figure IV. 35.

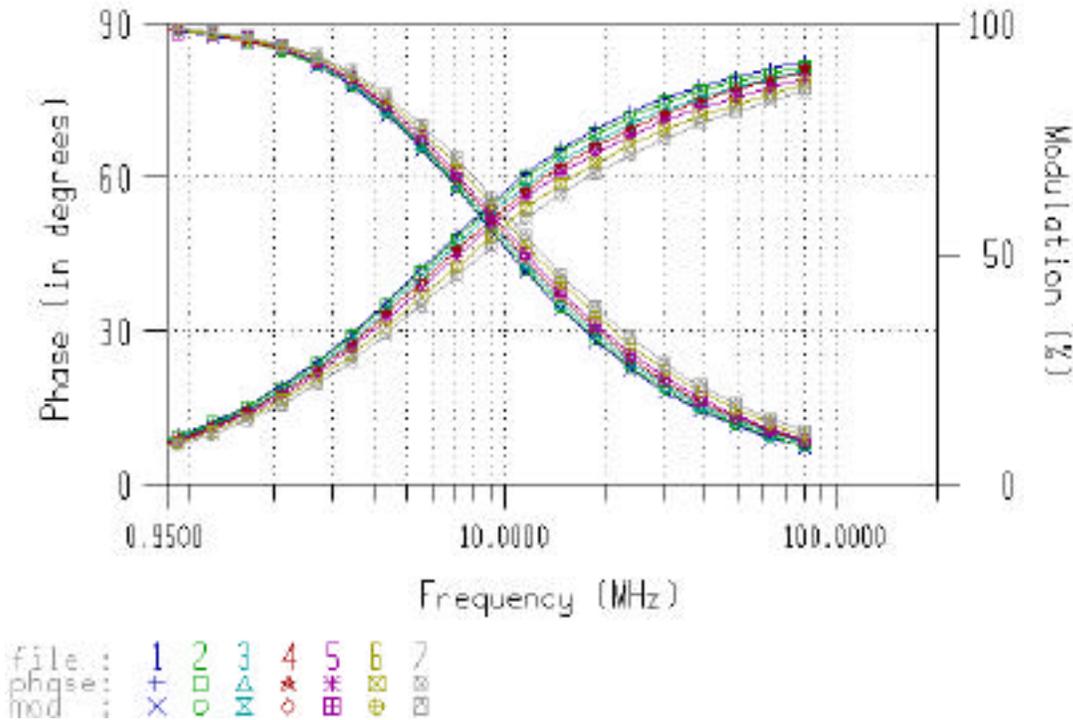


Figure IV. 35 : Courbes expérimentales de déphasage et de démodulation de la fluorescence en fonction de la fréquence d'excitation. Les courbes expérimentales des sept différents rapports de concentration éthidium/ARNt sont superposées et présentent des cinétiques différentes.

La première analyse globale consiste à ajuster les courbes par un modèle tri-exponentiel, une durée de vie correspondant à l'éthidium libre fixée à 1,8 ns et les deux autres libres. Le résultat de cette analyse est présenté figure IV. 36. A. La seconde durée de vie fluctue entre 5,7 et 7,9 ns quand la troisième décroît monotonement (de 27,1 à 24 ns) en fonction du rapport de concentration. Une deuxième analyse presque identique a été réalisée en liant la seconde durée de vie (Fig. IV. 36. B), donnant les mêmes résultats de décroissance monotone pour la troisième durée de vie. Pour ces analyses le $\chi^2 \sim 0,3$.

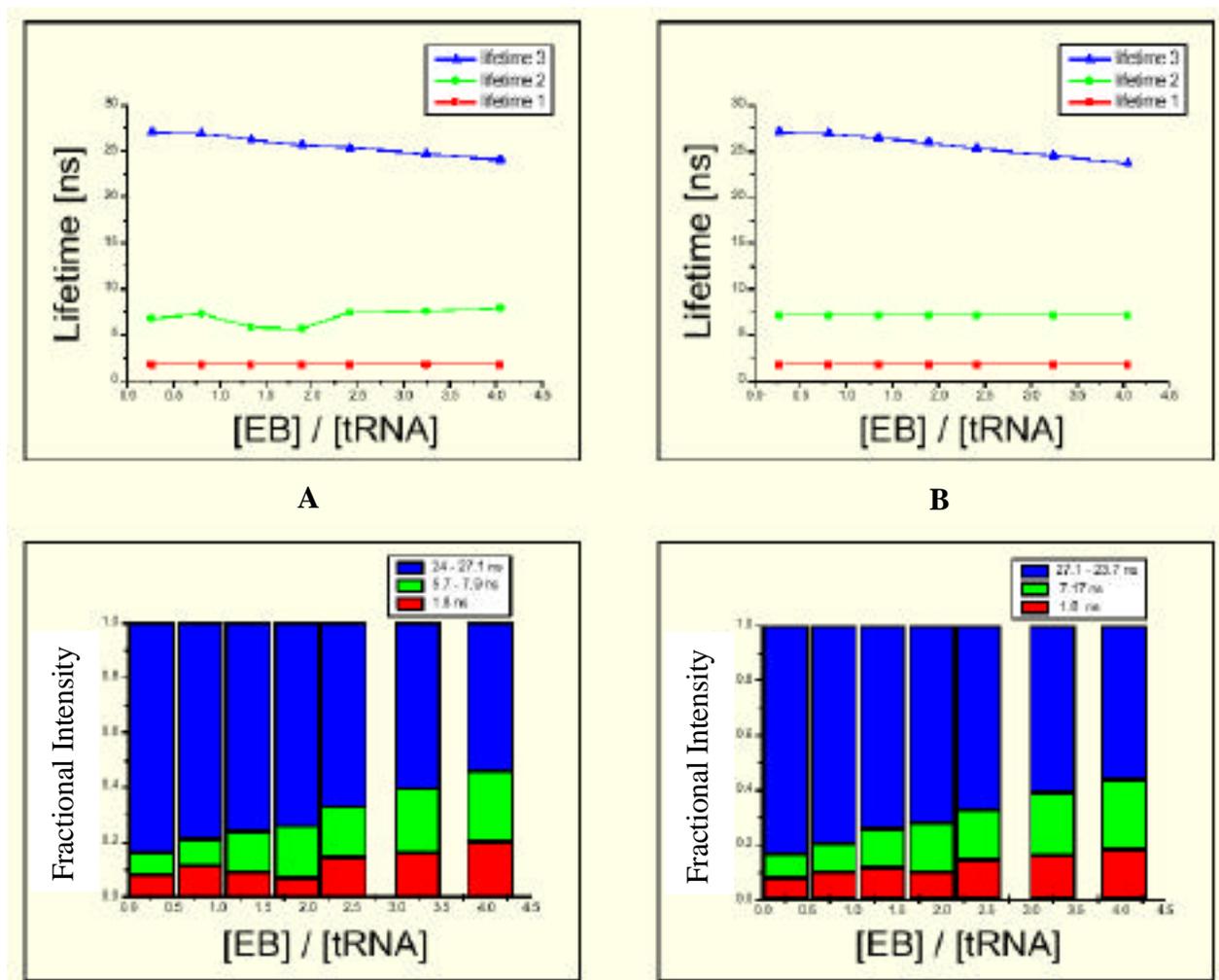


Figure IV. 36 : Résultats des analyses globales par un modèle tri-exponentiel.

(A) Modèle avec une durée de vie fixée à 1,8 ns (éthidium libre) et les deux autres complètement libres, (B) Modèle avec une durée de vie fixée à 1,8 ns, la seconde identique pour toutes les concentrations et la troisième complètement libre.

La décroissance monotone de la durée de vie longue en fonction de l'augmentation de la concentration d'éthidium soulève un problème. En effet, quelle que soit cette concentration, on s'attend à trouver au moins un certain nombre de molécules d'ARNt ayant une seule molécule d'éthidium intercalé, donc présentant une durée de vie de 27 ns. Une autre analyse globale sur les mêmes données a été effectuée en liant la durée de vie longue. Un ajustement de moins bonne qualité ($\chi^2 \sim 0,8$) a été obtenu. L'idée a alors été de rajouter une quatrième espèce. Une nouvelle analyse globale a été effectuée en liant les durées de vie (c'est à dire qu'on les suppose identiques quel que soit le rapport éthidium/ARNt). Le résultat de cette analyse est présenté figure IV. 37. La

qualité de cet ajustement est très bonne ($\chi^2 \sim 0,25$). Dans cette analyse, en plus de la durée de vie courte de 1,8 ns caractéristique de l'éthidium libre, les durées de vie sont de 5,4 ns, 17,7 ns et 27 ns. En fonction du rapport de concentration, l'amplitude pré-exponentielle de la durée de vie longue diminue tandis que les trois autres augmentent.

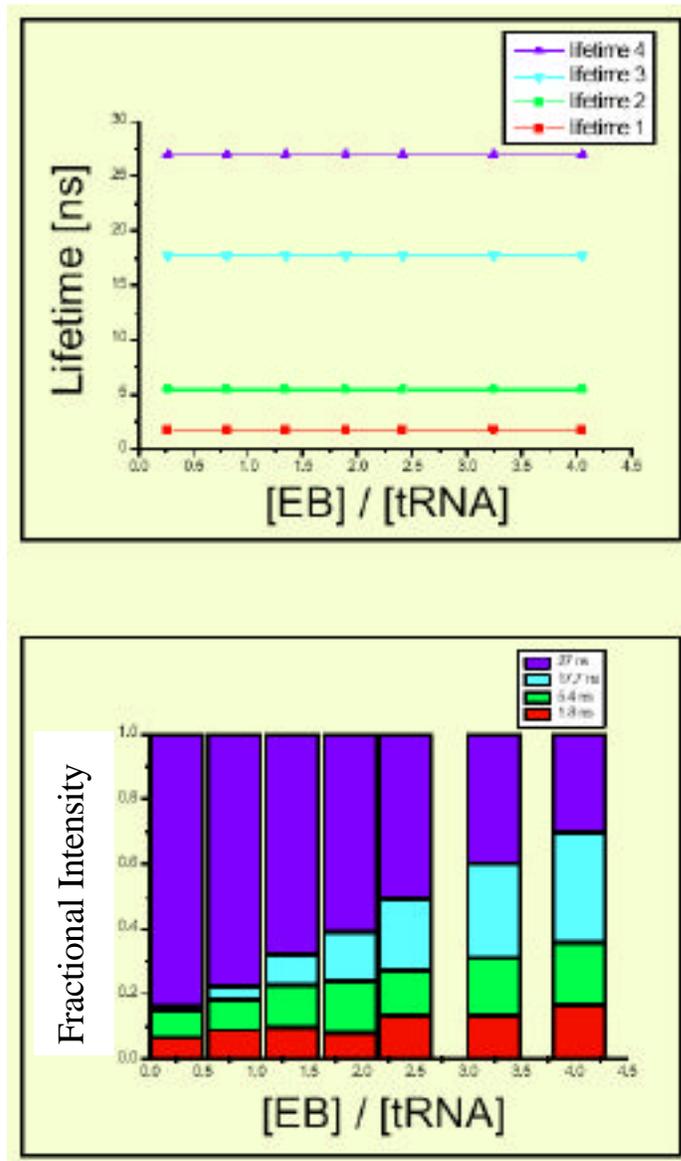


Figure IV. 37 : Résultat de l'analyse globale par un modèle à quatre exponentielles. Le modèle est constitué d'une durée de vie fixée à 1,8 ns (éthidium libre) et de trois autres durées de vie identiques pour toutes les concentrations.

L'interprétation de cette analyse repose sur l'existence de deux sites d'interactions de l'éthidium avec le ARNt^{phe} : un site principal où l'éthidium est intercalé (constante de dissociation de 1 – 2 μM selon des études préliminaires), et un site secondaire (constante de dissociation de l'ordre de 20 à 40 μM). Notre hypothèse est que le site principal correspondant à l'intercalation de l'éthidium est caractérisé par une durée de vie de 27 ns, si et seulement si le site secondaire (caractérisé par une durée de vie de 5,4 ns) au sein de la même molécule n'est pas occupé. Dans le cas contraire où le site secondaire est occupé, la durée de vie de l'éthidium dans son site principal diminue et vaut 17,7 ns (Fig. IV. 38).

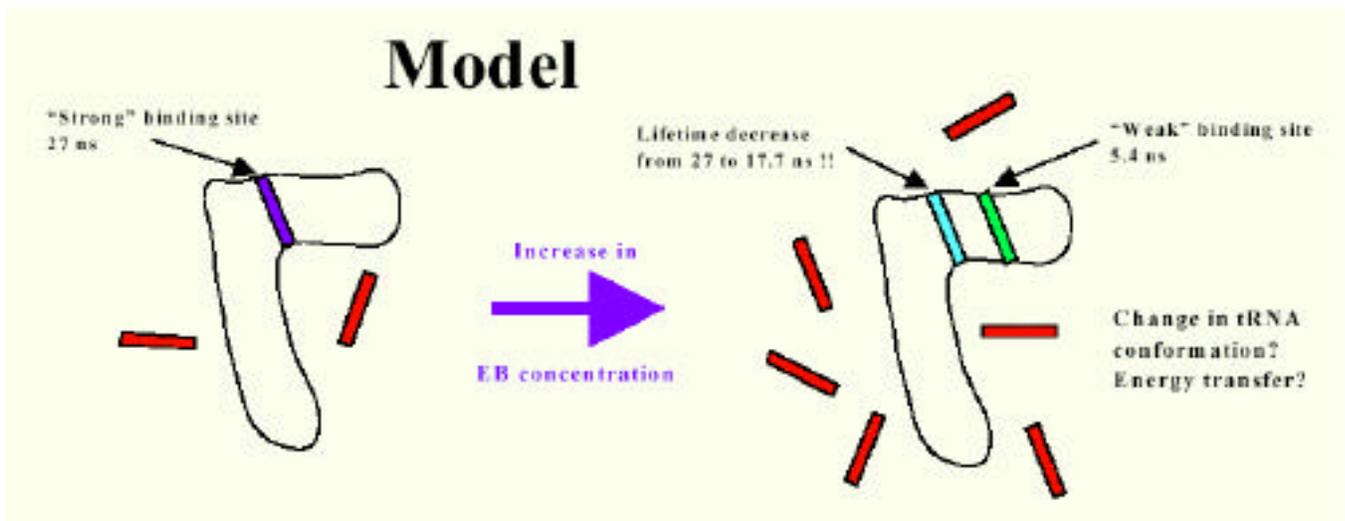


Figure IV. 38 : Modèle de l'interaction secondaire de l'éthidium à l'ARN de transfert. En augmentant la concentration d'éthidium, un second site d'interaction apparait. Lorsque l'ARNt intéragit avec deux éthidium, la durée de vie du site principal diminue soit par transfert d'énergie soit par changement conformationnel de l'ARNt.

Les études en fonction du solvant (de 0 à 900 mM de NaCl, 10 ou 20 mM MgCl₂) ne font pas varier les contributions de ces durées de vie. Concernant l'influence du NaCl, ces résultats sont intéressants, sachant qu'il est rapporté dans la littérature qu'une forte concentration de sel (> 300 mM) abolit les sites secondaires de l'éthidium (Wells & Cantor, 1977).

Des résultats de RMN (Chu et al., 1997, Jones & Kearns, 1975) suggèrent que le site principal d'interaction (vraisemblablement une intercalation) de l'éthidium est proche des paires de bases 6:67 et 7:66. Chu et collaborateurs suggèrent aussi qu'un second site de plus faible affinité se

trouve proche de la paire 4:69. Ces deux sites observés dans ce travail pourraient correspondre aux sites caractérisés par les durées de vie de 27 ns (et 17,7 ns) et 5,4 ns, respectivement. Si le site de plus faible affinité correspond à une intercalation de l'éthidium au niveau de la paire de base 4:69, ceci explique pourquoi l'augmentation de NaCl n'induit pas de dissociation de l'éthidium de ce site. En effet, seule une interaction électrostatique à l'extérieur des bases peut être dissociée par l'ajout de sodium. La faible durée de vie (5,4 ns) associée à cette intercalation peut s'expliquer par une déformation importante de la structure de la double hélice d'ARN à ce niveau de telle sorte que l'éthidium intercalé soit plus accessible au solvant que dans le cas d'une structure d'intercalation classique. En effet, si l'éthidium entre en contact avec des molécules d'eau, sa fluorescence sera éteinte par transfert de proton de l'éthidium vers la molécule d'eau avec diminution de sa durée de vie de fluorescence. Le même mécanisme d'"ouverture" du site d'intercalation peut expliquer la diminution de la durée de vie du site principal lorsque le site secondaire est occupé. L'existence d'un transfert d'énergie des molécules d'éthidium dans le site principal vers celles dans le site secondaire pourrait également expliquer cette diminution dans l'hypothèse où les deux sites d'intercalation seraient suffisamment proches. Pour choisir entre ces deux hypothèses (perturbation conformationnelle ou transfert d'énergie) expliquant la diminution de durée de vie de l'éthidium dans son site principal, des études pourraient être menées pour déterminer s'il existe un effet sur la polarisation de fluorescence lorsque l'on excite dans l'épaule rouge du spectre d'absorption (Red edge effect, (Weber & Shinitzky, 1970)), cet effet étant caractéristique du transfert d'énergie.

IV. 2. 2. 3. Intercalation de l'éthidium dans l'ADN nucléaire de cellules vivantes

L'éthidium pénètre dans les cellules vivantes comme cela a été montré précédemment (Coppey-Moisan et al., 1996, Delic et al., 1992, Favard et al., 1997, Hayashi et al., 1994), mais même en utilisant des détecteurs intensifiés pour l'imagerie conventionnelle de fluorescence, il n'est pas possible de détecter significativement l'intercalation de l'éthidium dans l'ADN nucléaire de cellules vivantes (Coppey-Moisan et al., 1996, Delic et al., 1991). Une étude de microspectrofluorométrie sur des glandes salivaires de drosophile suggère la présence d'éthidium libre et intercalé dans le

noyau (Favard et al., 1997). La fluorescence de l'éthidium en cellule vivante proliférante (cellules S2, expansion clonale provenant d'une cellule Vero transformée ou cellules C2, cellules de muscle de souris qui fusionnent et forment des myotubes lorsqu'elles sont confluentes) est présentée figure IV. 39.

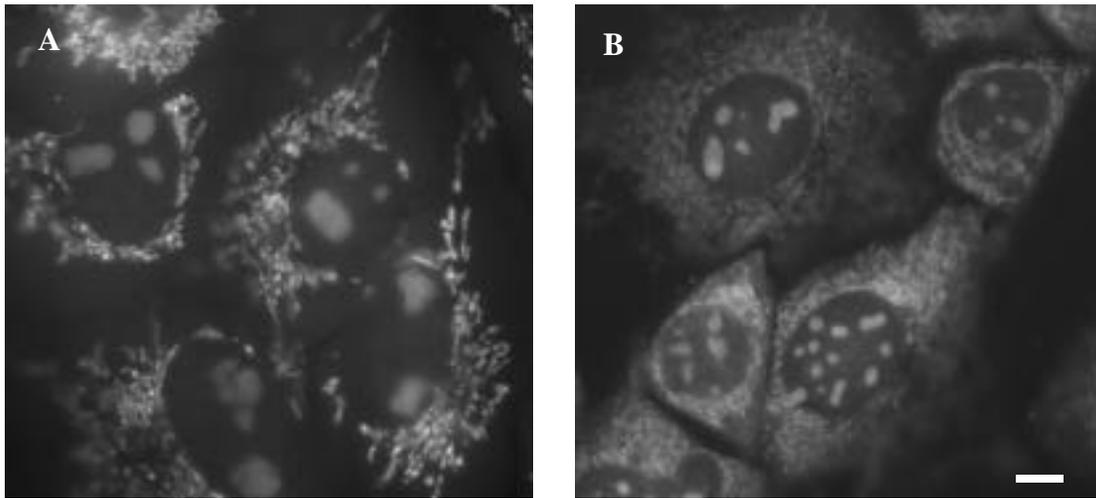


Figure IV. 39 : Localisation subcellulaire de la fluorescence de l'éthidium détectée en cellules vivantes. Les cellules, S2 (A) et C2 (B) ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes avec 4 µg/ml de bromure d'éthidium, puis la fluorescence a été visualisée à $\lambda_{exc} = 550 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 590 \text{ nm}$ en utilisant la caméra CCD. Barre en B = 10 µm.

Un faible niveau d'excitation est requis pour éviter les effets photodynamiques et la perturbation de la répartition subcellulaire du marquage de l'éthidium (Delic et al., 1991). Dans ces conditions, l'éthidium s'intercale dans l'ADN mitochondrial (Coppey-Moisan et al., 1996) et dans les régions doubles brins de l'ARN ribosomal nucléolaire (Delic et al., 1992), mais aucune intensité de fluorescence stationnaire n'est clairement détectable dans le noyau (excepté le nucléole) (Fig. IV. 39). En augmentant la concentration d'incubation de l'éthidium (de 4 à 100 µg/ml) dans les cellules S2, même s'il est délicat de visualiser clairement la fluorescence de l'éthidium dans le noyau, une quantification soignée avec correction du noir et de l'inhomogénéité du champ d'excitation (shading, voir Ch. VII.), permet malgré tout de caractériser une augmentation de la fluorescence moyenne du noyau (intensité / pixel) (Fig. IV. 40). Cette augmentation n'est pas linéaire et reste très inférieure à celle mesurée sur cellules mortes.

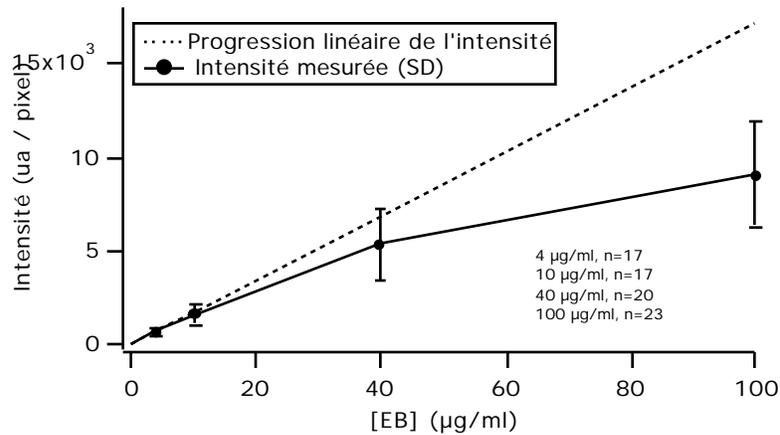


Figure IV. 40 : Quantification de l'intensité de fluorescence de l'éthidium dans le noyau de cellules S2 en fonction de la concentration d'incubation.

Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes avec 4, 10, 40 et 100 µg/ml de bromure d'éthidium, puis la fluorescence a été visualisée à $\lambda_{exc} = 550 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 590 \text{ nm}$ en utilisant la caméra CCD. Après soustraction du noir et correction de l'inhomogénéité du champ, l'intensité moyenne par pixel a été mesurée pour plusieurs cellules. La barre d'erreur représente la déviation standard des intensités mesurées. La droite pointillée représente la progression linéaire de l'intensité à partir des deux premières valeurs.

IV. 2. 2. 3. 1. Evidences de l'intercalation de l'éthidium dans l'ADN nucléaire

Malgré les très faibles niveaux de fluorescence de l'éthidium, la présence d'éthidium sous formes libre et intercalée dans le noyau de cellules vivantes a été établie par l'acquisition des déclin de fluorescence à l'aide du montage confocal. Le fait que les photons de fluorescence soient corrélés en temps au contraire du bruit, augmente le rapport signal sur bruit et donc la sensibilité du système, ce qui permet d'extraire un très faible signal de fluorescence des mesures. Les déclin, successivement mesurés dans le milieu extracellulaire et dans le noyau (nucléoles exclus) sur une même cellule et en présence d'éthidium dans le milieu extracellulaire (1 µg/ml, concentration d'incubation), sont présentés figure IV. 41. La figure IV. 41. A présente la fluorescence stationnaire mesurée par imagerie conventionnelle, la figure IV. 41. B présente les déclin obtenus. Dans le milieu extracellulaire, un unique temps de déclin court de 1,8 ns, caractéristique de l'éthidium libre est obtenu par ajustement. Dans le noyau, un déclin bi-exponentiel est observé avec des durées de vie de 1,8 ns (éthidium libre) et 22 ns. Le long temps de vie est caractéristique de l'éthidium intercalé dans l'ADN (Ch. IV. 2. 2. 1).

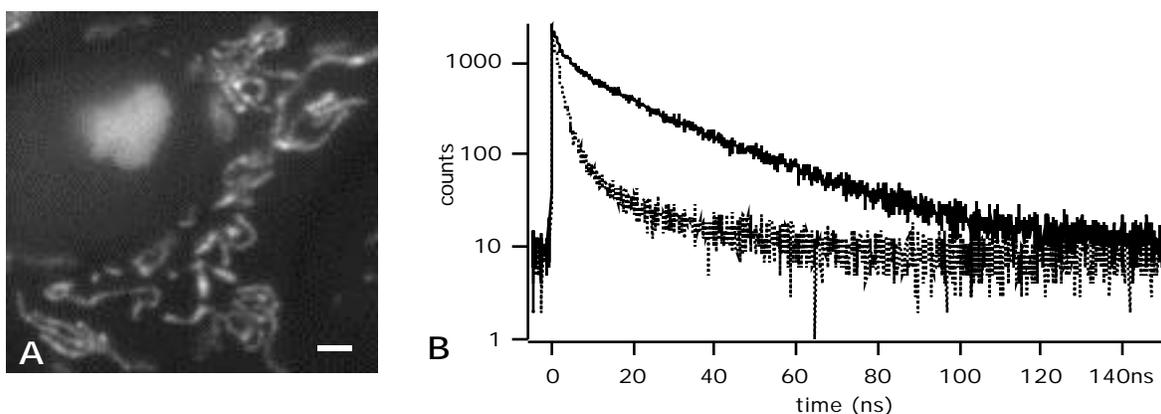


Figure IV. 41 : Mise en évidence de l'intercalation de l'éthidium dans la chromatine de cellules S2 vivantes. (A) Image de fluorescence stationnaire d'un cellule S2 vivante ; (B) Déclins de fluorescence en microscopie confocale provenant d'un petit volume ($1 \mu\text{m}^3$) de la chromatine (continu) et provenant d'un même volume du milieu extracellulaire (pointillé). Les cellules S2 ont été incubées pendant 30 minutes en présence de $1 \mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium à 37°C . Barre en A = $5 \mu\text{m}$.

Une comparaison des déclins de fluorescence obtenus dans le noyau en présence d'éthidium à différentes concentrations d'incubation (0,4, 1 et $10 \mu\text{g/ml}$) et de ce qui est obtenu pour une solution d'ADN de phage est présentée figure IV. 42.

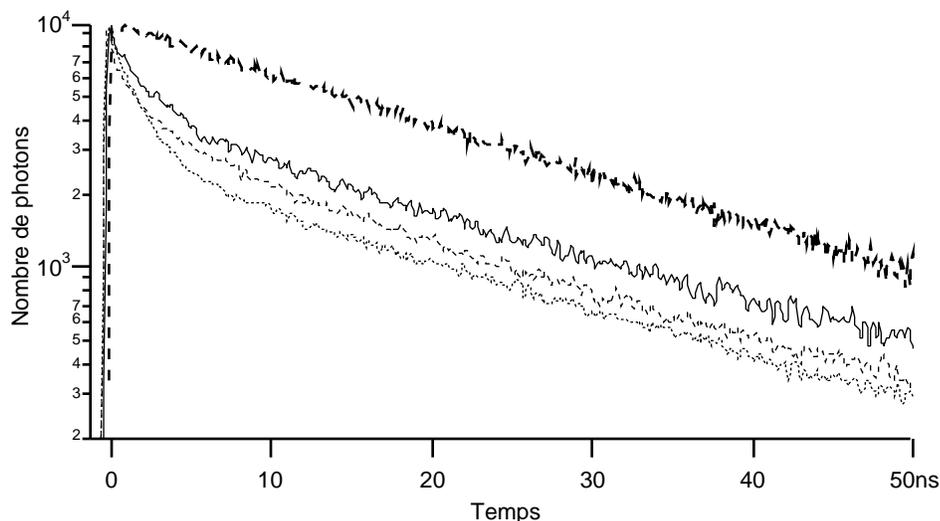


Figure IV. 42 : Déclins de fluorescence normalisés de l'éthidium provenant d'une solution d'ADN et du noyau de cellules vivantes.

De haut en bas : ADN de phage / éthidium, S2 / $0,4 \mu\text{g/ml}$ d'éthidium, S2 / $1 \mu\text{g/ml}$ d'éthidium et S2 / $10 \mu\text{g/ml}$ d'éthidium. Les cellules ont été pré-incubées avec l'éthidium pendant 30 minutes dans le DMEM à 37°C . Les mesures ont été effectuées dans l'HBSS tamponné en présence de bromure d'éthidium avec les mêmes concentrations que celles utilisées pour la pré-incubation.

Au moins deux durées de vie sont présentes dans les déclins mesurés dans le noyau de cellule vivante. Comparativement, la cinétique de fluorescence pour l'échantillon d'ADN de phage est

mono-exponentielle. Les paramètres d'ajustements des courbes de la figure IV. 42 sont présentés table IV. 8. Ces paramètres révèlent que la majorité des molécules d'éthidium (~ 60%) présentes dans le noyau sont sous forme libre. Bien que le rapport éthidium par paire de base soit plus important dans la solution d'ADN (1 / 15) que dans le noyau (compris entre 1 / 10⁴ et 1 / 10³, voir Ch. IV. 2. 2. 3. 2), aucun éthidium libre n'est détecté dans la solution, toutes les molécules d'éthidium étant intercalées avec une durée de vie de 21,3 ns (Table IV. 8).

Table IV. 8 : Paramètres cinétiques de la fluorescence de l'éthidium dans une solution d'ADN de phage et dans le noyau de cellules S2 vivantes.

	a ₁	τ ₁	a ₂	τ ₂	a ₃	τ ₃	r ²
ADN	1	21.3					1.009
ADN nucléaire							
0.4 µg/ml	0.40	22.1			0.60	2.08	1.187
1 µg/ml	0.36	21.0			0.64	1.95	1.481
10 µg/ml	0.20	26.5	0.07	10.8	0.73	1.85	1.218

Après déconvolution de la réponse instrumentale, les ajustements des déclin de fluorescence de la figure IV. 42 sont obtenus avec une, deux ou trois durées de vie. a₁, a₂, et a₃ sont les facteurs pré-exponentiel de chaque durée de vie (somme des a_i = 1). Les valeurs de r² indiquent la qualité de l'ajustement.

La présence d'éthidium libre dans le noyau dans une large gamme de concentration (0,1 – 10 µg/ml) montre clairement une forte inhibition d'intercalation dans l'ADN nucléaire comme suggéré par la figure IV. 40. A 10 µg/ml, on observe une faible proportion d'éthidium (moins de 10%) présentant une durée de vie intermédiaire. La présence d'une durée de vie intermédiaire avait déjà pu être mise en évidence en observant des structures d'ADN en peigne (Hernandez et al., 1994), en mesurant la durée de vie de l'éthidium adsorbée à la caféine (Larsen et al., 1996), ou pour l'ARN de transfert en solution (voir Ch. IV. 2. 2. 2). On peut donc interpréter cette durée de vie intermédiaire soit comme un site d'interaction éthidium / ADN de plus faible affinité, soit par l'interaction non spécifique de l'éthidium avec d'autres macromolécules nucléaires.

IV. 2. 2. 3. 2. Mesure des concentrations intracellulaires de l'éthidium libre et intercalé

En prenant avantage des deux durées de vie différentes associées aux deux formes, libre ou intercalée, de l'éthidium et en faisant l'hypothèse que la durée de vie radiative est identique pour la forme libre et pour la forme intercalée, comme cela a été proposé par Olmsted et Kearns (Olmsted III & Kearns, 1977), les concentrations d'éthidium nucléaire libre et intercalé ont été calculées à partir de la mesure des déclin de fluorescence dans le milieu extracellulaire et dans le noyau.

Deux déclin ont été mesurés avec le même temps d'acquisition (200 secondes), le laser étant focalisé dans le milieu extracellulaire puis dans le noyau. Ces déclin ont été analysés en fixant les durées de vie à 1,8 ns (celle de l'éthidium libre) et à 22 ns (celle de l'éthidium intercalé). Ainsi, a_0 , a_{lib} et a_{int} sont les facteurs pré-exponentiels intervenant dans les équations

$$i_{ext}(t) = a_0 \exp(-t / \tau_{lib}) \quad (IV. 2. 3)$$

$$i_{noy}(t) = a_{lib} \exp(-t / \tau_{lib}) + a_{int} \exp(-t / \tau_{int}) \quad (IV. 2. 4)$$

avec a_0 correspondant à l'éthidium libre dans le milieu extracellulaire, a_{lib} et a_{int} correspondant à l'éthidium libre et intercalé dans le noyau, respectivement. Pour chaque déclin, la relation liant le facteur pré-exponentiel, a , à la concentration de l'espèce, C , est

$$a = K C k_r \quad (IV. 2. 5)$$

où ϵ est le coefficient d'extinction molaire, k_r la constante de vitesse radiative et K un facteur qui dépend des conditions expérimentales (volume focal, puissance du laser, temps d'acquisition). En supposant que les variations expérimentales sont négligeables ($K = \text{constante}$), que l'éthidium libre a des propriétés de fluorescence identiques dans le noyau et le milieu extracellulaire, que la durée de vie radiative est identique pour l'espèce libre et intercalée (Olmsted III & Kearns, 1977), on a

$$a_0 / a_{lib} = C_0 / C_{lib} \quad (IV. 2. 6)$$

et

$$a_{lib} / a_{int} = \tau_{lib} C_{lib} / \tau_{int} C_{int} \quad (IV. 2. 7)$$

où $\tau_{lib} / \tau_{int} = 1,456$ à 498 nm, longueur d'onde d'excitation. Ainsi C_{lib} et C_{int} ont été calculées connaissant C_0 , la concentration d'incubation (cette concentration a été précisément mesurée par spectrofluorimétrie en prélevant le milieu extracellulaire juste après l'acquisition des déclin).

Les valeurs obtenues du calcul des concentrations dans les cellules S2 sont présentées table IV. 9 pour trois concentrations différentes d'éthidium.

Table IV. 9 : Quantification de l'éthidium libre et intercalé dans le noyau de cellules vivantes à différentes concentrations extracellulaires

C_o μg/ml	a_o	a_{lib}	a_{int}	C_{lib} μg/ml	C_{int} μg/ml	Et/pb
0.07	0.043±0.004	0.105±0.010	0.023±0.002	0.17±0.04	0.06±0.02	0.0001
0.30	0.168±0.009	0.211±0.014	0.080±0.003	0.38±0.05	0.21±0.06	0.0003
0.67	0.383±0.018	0.274±0.014	0.138±0.004	0.48±0.05	0.35±0.07	0.0005

a_o et a_{lib} sont les facteurs pré-exponentiels des ajustements, correspondant à l'éthidium libre dans le milieu extracellulaire et dans le noyau, respectivement. a_{int} est le facteur pré-exponentiel correspondant à l'éthidium intercalé dans le noyau. C_o et C_{lib} sont les concentrations de l'éthidium libre dans le milieu extracellulaire et dans le noyau, respectivement. C_{int} est la concentration de l'éthidium intercalé dans le noyau. Le rapport Et/pb (éthidium par paire de bases) a été estimé en considérant le noyau comme une sphère de 10 μm de rayon, contenant une moyenne de $2 \cdot 10^{10}$ paires de bases. Les erreurs présentées pour les a_i proviennent des domaines de confiance donnés par l'ajustement. Les erreurs présentées pour les C_i ont été obtenues en calculant les valeurs extrêmes de concentration en utilisant les valeurs extrêmes des a_i .

En utilisant cette méthode, l'autofluorescence nucléaire et la fluorescence provenant d'une espèce avec une durée de vie intermédiaire (voir Ch. IV. 2. 2. 3. 1) sont négligées. En effet, les cellules non marquées à l'éthidium présentent deux durées de vie dominantes, 400 ps (80%) et 3,5 ns (20%), caractéristiques de l'autofluorescence nucléaire et différentes des durées de vie de l'éthidium. De plus, cette contribution n'excède jamais 15% de la fluorescence de l'éthidium, même à la plus faible concentration utilisée ici. Les petites différences de concentration de l'éthidium libre dans le noyau et dans le milieu extracellulaire (Table IV. 9) peuvent s'expliquer par le fait que l'on néglige la contribution de l'autofluorescence dans les calculs. Néanmoins, il est clair que les membranes cytoplasmiques et cellulaires n'empêchent pas la diffusion de l'éthidium à l'intérieur de la cellule. Il semble qu'il s'établisse un équilibre de concentration de l'éthidium libre de part et d'autre des membranes.

En utilisant la valeur de concentration de l'éthidium intercalé et en négligeant l'intercalation dans des régions double-brin des ARN dans le noyau (excepté les nucléoles), le rapport du nombre d'éthidium intercalé par paires de bases a été caractérisé. Ce rapport est présenté table IV. 9 en supposant que le noyau est une sphère de 10 μm de rayon contenant une moyenne de $2 \cdot 10^{10}$ paires de bases (pour ce type de cellule). Les cellules mesurées pourraient néanmoins être en phase G2 du cycle. Comme on ne peut discriminer entre la phase G1 et la phase G2, les rapports Et/pb pourraient être divisés par deux. Ainsi, pour la plus faible concentration d'éthidium, il est possible de détecter aussi peu qu'un éthidium pour 10000 paires de bases, ce qui représente quelques centaines de molécules d'éthidium intercalé dans le volume focal observé ($1 \mu\text{m}^3$). Cela montre en quoi la technique du comptage de photons uniques corrélés en temps s'avère excessivement sensible, peu perturbante (faibles niveaux d'excitation) et donc particulièrement adaptée aux études en cellule vivante.

IV. 2. 2. 3. 3. Perturbations du marquage nucléaire de l'éthidium par perméabilisation

On peut penser que l'inhibition d'intercalation dans le noyau de cellules vivantes, en comparaison avec ce qui se passe *in vitro*, puisse provenir de la haute compaction de l'ADN chromatinien. Cette hypothèse ne tient pas en étudiant la perturbation du marquage nucléaire de l'éthidium après perméabilisation.

Des études d'imagerie conventionnelle ont été menées pour caractériser la distribution de la fluorescence nucléaire de l'éthidium après traitement à la digitonine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La figure IV. 43 présente la fluorescence du Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), interagissant dans le petit sillon de la double hélice d'ADN, et de l'éthidium (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pour une même cellule avant et après traitement à la digitonine.

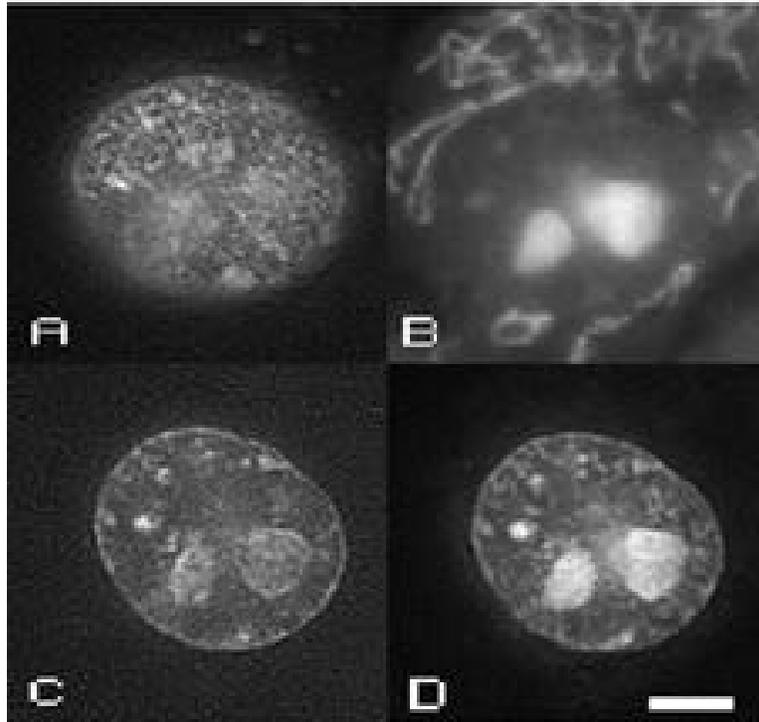


Figure IV. 43 : Perturbation du marquage nucléaire de l'éthidium par traitement à la digitonine. Images de fluorescence stationnaire d'une même cellule S2 vivante (A, B) et après perméabilisation par la digitonine (C, D). (A et C) : Fluorescence du Hoechst 33342, $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$, $DO = 2$, et $480 < \lambda_{em} < 520 \text{ nm}$. (B et D) Fluorescence de l'éthidium, $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$, $DO = 2$, et $\lambda_{em} > 590 \text{ nm}$. Barre = $10 \mu\text{m}$.

Le volume du noyau, visualisé par la fluorescence du Hoechst 33342, et donc la compaction globale de l'ADN n'a pas varié avant (Fig. IV. 43 A) et après (Fig. IV. 43. C) traitement à la digitonine. L'augmentation de l'intercalation de l'éthidium après traitement (Fig. IV. 43. D) ne peut pas correspondre à une meilleure accessibilité de l'éthidium au noyau, sachant qu'à l'état non perturbé, l'éthidium pénètre aisément dans le noyau (voir Ch. IV. 2. 2. 3. 2). De plus, la distribution de fluorescence de l'éthidium à l'état perturbé (Fig. IV. 43. D) coïncide avec les régions de chromatine fortement condensées, proches de la membrane nucléaire et autour des nucléoles, visualisées par la fluorescence du Hoechst 33342 (Fig. IV. 43. C). Par traitement à la digitonine, l'inhibition de l'intercalation caractéristique de l'état vivant se relâche partiellement, le marquage par l'éthidium est perturbé. La perte du marquage mitochondrial que l'on observe entre la figure IV. 43. B et la figure IV. 43. D est en accord avec des observations précédentes du laboratoire montrant qu'une diminution du gradient électrochimique mitochondrial déclenche l'extinction (ou la diminution) de la fluorescence de l'éthidium pré-intercalé dans l'ADN mitochondrial (Coppey-Moisan et al., 1996,

Durieux et al., 1999). Ici, la digitonine est supposée collapser le gradient électrochimique par perméabilisation de la membrane mitochondriale interne.

Les effets de la digitonine sur le noyau ne sont pas bien connus. L'observation que nous faisons de la perturbation de la chromatine peut aussi bien être due à un effet direct de la digitonine sur la chromatine qu'à un effet indirect provenant de la perméabilisation qui modifierait la composition ionique du noyau. Dans tous les cas, notre interprétation va dans le sens d'une modification des interactions ADN-protéines, après perméabilisation, ce qui désinhiberait l'intercalation de l'éthidium. D'autres résultats vont dans ce sens (voir Ch. V. 3) et cette hypothèse sera rediscutée au chapitre V. 3.

Chapitre V : Résultats biologiques

L'objet central de cette étude est de démontrer la faisabilité et les potentialités de la technique de photons uniques corrélés en temps pour étudier la dynamique et les interactions de macromolécules en cellules vivantes. Les résultats présentés concernent des mesures de FRET et de déclin d'anisotropie menées dans trois thématiques biologiques distinctes dont l'une fait l'objet d'une collaboration extérieure au laboratoire. Toutes ces thématiques ont en commun une même approche de marquage endogène de macromolécules et d'étude en cellule vivante, sous microscope.

V. 1. Interactions de protéines hétérologues

En collaboration avec V. Mignotte et son équipe (Hôpital Cochin, Paris), nous avons étudié en cellules vivantes l'interaction de la protéine p45 du facteur de transcription NF-E2 (Nuclear Factor Erythroïde 2) avec différents partenaires : (i) avec la protéine Maf G (de la famille des petites protéines Maf) constitutive de NF-E2, et (ii) avec un partenaire cytoplasmique (PC). L'approche a consisté à fusionner chaque partenaire potentiel avec une des deux protéines autofluorescentes, la GFP et la DsRed, de co-transfecter les plasmides recombinants pour exprimer ces protéines et d'étudier en cellules vivantes le déclin de fluorescence de la GFP pour mesurer le FRET, caractéristique d'une distance entre les chromophores de quelques dizaines d'Angstroms, distance à laquelle l'interaction directe entre les deux protéines fusions est plus que probable.

V. 1. 1. Le facteur de transcription NF-E2

L'hématopoïèse est le système de renouvellement continu des cellules sanguines différenciées (érythrocytes, mégacaryocytes, lymphocytes...) à partir de cellules souches pluripotentes. Les mégacaryocytes sont de grandes cellules polyploïdes localisées dans la moelle osseuse. Elles subissent une remarquable transformation cellulaire en accroissant leur ploïdie par un processus d'endomitoses successives. Lors de cette maturation, la membrane plasmique s'invagine donnant naissance à des membranes de démarcation intra-cytoplasmique. Une fois matures, les mégacaryocytes produisent alors les plaquettes sanguines par fragmentation de leur cytoplasme (à

raison de 20 à 30 milliards de plaquettes par litre de sang et par jour chez l'humain). Une des théories suggérées pour la formation de plaquettes à partir des mégacaryocytes, ou thrombopoïèse, implique la dilatation du système de membranes de démarcation et l'élongation des proplaquettes, extensions filamenteuses identifiables des mégacaryocytes (Cramer, 1999).

Au cours de ces dernières années, il a été montré que plusieurs facteurs de transcription jouaient un rôle majeur dans la différenciation hématopoïétique. En particulier, NF-E2 est indispensable à la formation des plaquettes sanguines. Ce facteur de transcription a été identifié à l'origine par sa capacité à interagir *in vitro* avec le promoteur de la porphobilogène déaminase (PBGD) (Mignotte et al., 1989). Il se fixe à un motif de type AP1 étendu (GCTGA(G/C)TCA) que l'on retrouve dans les régions régulatrices de gènes érythrocytaires et mégacaryocytaires : le promoteur de la PBGD, de la ferrochélatase (Tugores et al., 1994), un sous-ensemble de gènes impliquant la voie de synthèse de l'hème, l'élément LCR (Locus Control Region) de la α -globine (Talbot & Grosveld, 1991), et le promoteur de la thromboxane synthétase (Deveaux et al., 1997).

NF-E2 est un hétérodimère constitué d'une sous-unité de 45 kDa (p45) dont l'expression est restreinte aux cellules des lignées érythroïde, mégacaryocytaire et monocyttaire (Andrews et al., 1993) et d'une sous-unité de 18 kDa, qui appartient à la famille des petites protéines Maf (Igarashi et al., 1994). Les petites Maf sont synthétisées largement durant le développement et dans les tissus adultes, mais leur niveau d'expression varie considérablement (Blank & Andrews, 1997). Les deux sous-unités possèdent un domaine basique suivi d'un domaine bZip (leucine zipper). Le domaine basique interagit avec le grand sillon de l'ADN par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes, tandis que le domaine bZip constitué de 2 hélices parallèles offre une interface hydrophobe propice aux interactions protéine-protéine. Seul p45 possède un domaine transactivateur, situé en N-terminal.

Les souris déficientes en p45 souffrent d'un taux élevé de mortalité périnatale due à une thrombopénie absolue (absence de plaquettes). Cependant les mégacaryocytes sont abondants dans la moelle osseuse et sont caractérisés par un cytoplasme de grande taille mais ils ne sont pas capables de former des plaquettes (Shivdasani et al., 1995). De la même manière, l'inactivation de

MafG induit chez les souris mutantes une forte diminution du nombre de plaquettes et une prolifération des mégacaryocytes (Onodera et al., 2000, Shavit et al., 1998). L'hétérodimère p45-MafG est indispensable à la thrombopoïèse.

V. 1. 2. Résultats

Dans ce travail, deux interactions de protéines avec p45 ont été étudiées. Dans un premier temps, il a été confirmé l'interaction de p45 avec MafG dans le noyau, constituant le facteur de transcription NF-E2. Dans un second temps, l'interaction de p45 avec un partenaire de localisation cytoplasmique (PC) caractérisé par le système double-hybride a été étudiée. Ces deux interactions ont été suivies par FRET en utilisant le couple GFP/DsRed (Ch. IV. 2. 1. 3. 3) et le montage DL caractérisé chapitre IV. 1.

V. 1. 2. 1. Interaction p45 – MafG dans le noyau

Les protéines fusion GFP-p45 et DsRed-MafG, effectuées par l'équipe de V. Mignotte, ont été construites avec la protéine autofluorescente en position N-terminale des deux protéines. Les constructions en position N-terminale ont été choisies en fonction des structures primaires et secondaires (domaine bZip) connues de ces deux protéines et selon l'organisation supposée de l'hétérodimère en interaction avec l'ADN (Fig. V. 1).

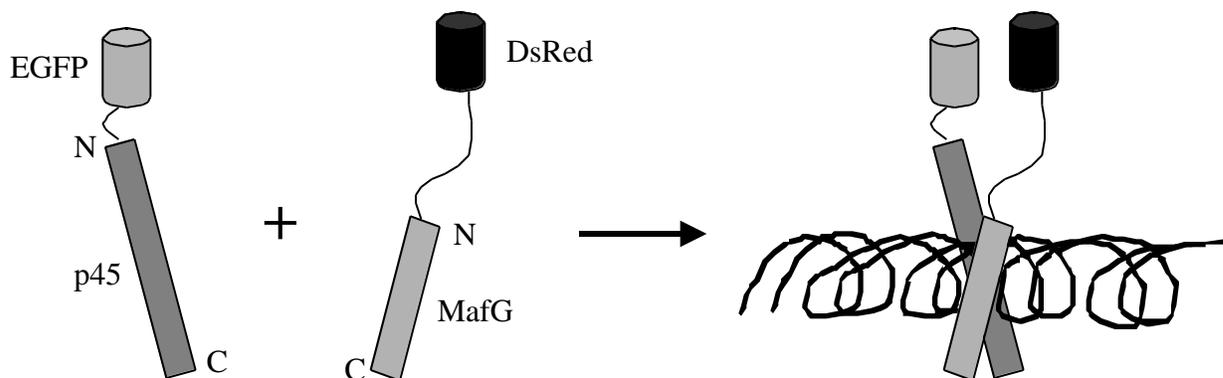


Figure V. 1 : Schéma de l'interaction supposée entre GFP-p45 et DsRed-MafG.

Dix-neuf et seize acides aminés séparent la DsRed de la protéine MafG et la GFP de la protéine p45, respectivement. Les protéines fusion ont été vérifiées par la technique de Western. Après co-expression en cellule HeLa, la localisation subcellulaire de GFP-p45 et de DsRed-MafG est exclusivement nucléaire et ces deux protéines sont colocalisées. La figure V. 2 présente une expérience caractéristique de mesure de déclin de fluorescence de la GFP dans le contexte d'une co-expression, obtenue avec le DL et à $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$. En excitant à 480 nm, la DsRed est aussi excitée, mais la fluorescence provenant uniquement de la GFP est sélectionnée à l'émission grâce au filtre optique à bande passante qui va rejeter la contribution de fluorescence de la DsRed. Les images V. 2. A, B et C présentent les images GFP et DsRed obtenues avec la CCD et leur superposition (pour la fluorescence de la DsRed, $\lambda_{exc} = 548 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 590 \text{ nm}$). L'histogramme 2D (Fig. V. 2. E) a été intégré sur toute la ligne du DL pour construire le déclin présenté figure V. 2. D. On peut déjà observer à l'œil qu'en échelle logarithmique le déclin n'est pas droit. L'analyse globale (voir Ch. III. 3. 2) obtenue en utilisant un modèle mono-exponentiel ($\chi^2 = 2,77$) confirme le mauvais ajustement de ces données expérimentales avec une unique durée de vie. L'analyse globale effectuée à l'aide d'un modèle bi-exponentiel est bien meilleure ($\chi^2 = 1,78$) et présente deux durées de vie, 2,74 ns et 0,84 ns, dont les contributions (coefficients pré-exponentiels) sont présentées sous la forme de deux courbes figure V. 2. F. La comparaison des χ^2 démontre l'existence d'une durée de vie courte dans le déclin de GFP-p45. La durée de vie de 2,74 ns est conforme aux durées de vie de la GFP mesurées en absence de DsRed-MafG (voir Ch. IV. 2. 1). La durée de vie de 0,84 ns proviendrait de la fluorescence de la GFP transférant son énergie à la DsRed proche. Cela prouverait bien l'interaction de p45 avec MafG en cellule vivante au sein du noyau. En analysant les contributions de chaque durée de vie, obtenues par cet ajustement bi-exponentiel, la proportion de protéines p45 en interaction est de l'ordre de 50 % quelle que soit la localisation nucléaire. Cinq mesures indépendantes sur des cellules différentes ont été effectuées, donnant comme résultat $2,87 \pm 0,17 \text{ ns}$ et $0,88 \pm 0,13 \text{ ns}$ (SD), les proportions de p45 en interaction variant de 30 à 70 % selon les cellules. Dans toutes ces expériences, tous les χ^2 obtenus avec un modèle bi-

exponentiel sont sensiblement meilleurs que ceux qui sont obtenus avec un modèle mono-exponentiel.

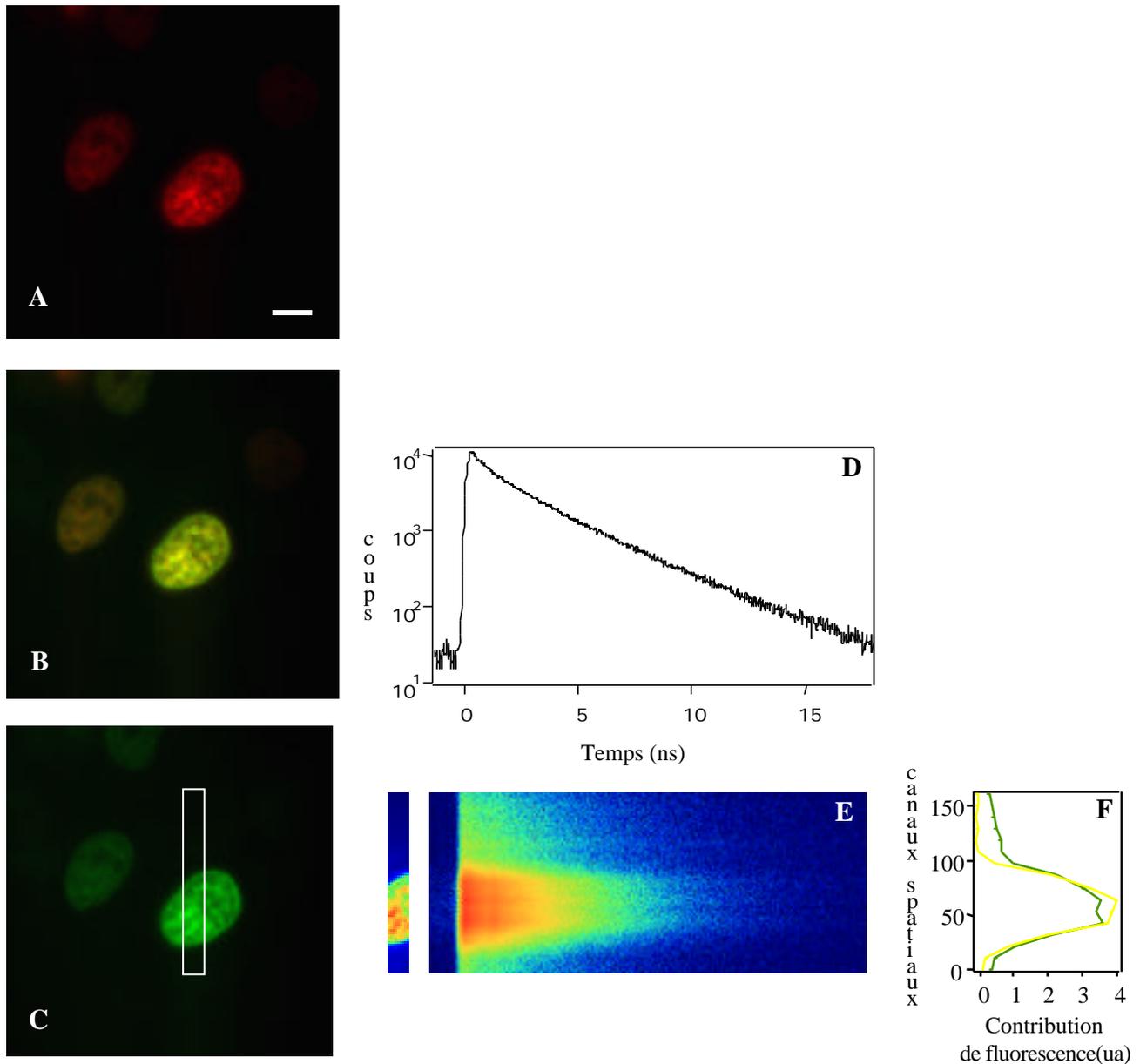


Figure V. 2 : Acquisition DL de la fluorescence de la GFP provenant d'une cellule HeLa co-exprimant GFP-p45 et DsRed-MafG.

Les images de fluorescence stationnaire ont été acquises par la caméra CCD à $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$ pour la GFP (C) et $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 590 \text{ nm}$ pour la DsRed (A). Une superposition des images est présentée en B. Sur l'image C est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition DL a été menée à $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$ et est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés (E). L'intégrale simple en fonction de la position de cet histogramme correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe (D). C'est le déclin de fluorescence total de la GFP mesuré par le DL. Le résultat de l'analyse globale des 16 déclins obtenus en intégrant 10 canaux par 10 canaux suivant la direction position est présenté en F par les courbes de contribution (coefficients pré-exponentiels) des deux durées de vie : 2,74 ns (vert) et 0,84 ns (jaune). Barre en A = 10 μm .

Pour démontrer que la durée de vie courte de la GFP (0,88 ns) mesurée dans ces expériences est bien la conséquence d'une interaction GFP-p45 et DsRed-MafG, des expériences de contrôle ont été menées dans différentes conditions de transfection sur ce même modèle cellulaire. Les résultats des analyses sont présentés table V. 1.

Table V. 1 : Paramètres cinétiques de fluorescence de la GFP fusionnée ou non à p45 selon différentes conditions de transfection.

Protéines	Localisation cellulaire	a_1	τ_1 (ns)	a_2	τ_2 (ns)
GFP	Cytoplasme/noyau	1	2.49		
GFP/DsRed	Cytoplasme/noyau	1	2.58		
GFP-p45	Noyau	1	2.56		
GFP-p45/DsRed-MafG	Noyau	0.48	2.74	0.52	0.84

Dans le cas d'une monotransfection de la GFP, fusionnée ou non à p45, l'ajustement mono-exponentiel est satisfaisant (voir Ch. V. 2. 1. 2). Lorsque la GFP et la DsRed sont co-exprimées dans une même cellule, leur fluorescence verte et rouge sont colocalisées, toutes deux de manière diffuse, dans le noyau et le cytoplasme. Dans ce cas aussi, l'analyse mono-exponentielle est satisfaisante et présente une durée de vie de 2,58 ns. Ces résultats démontrent que la GFP et la DsRed seules n'interagissent pas et ne génèrent pas de signal de FRET. Seul l'ajustement des données expérimentales provenant de la co-transfection GFP-p45 et DsRed-MafG nécessite un modèle bi-exponentiel. Des mesures de la fluorescence de la DsRed, seule ou fusionnée, en sélectionnant cette fois-ci la fluorescence rouge ($\lambda_{em} > 510$ nm) permettent d'identifier la durée de vie de cette protéine dont le déclin a toujours été mono-exponentiel ($\tau = 3,5$ ns, voir Ch. IV. 2. 1. 1. 5). L'absence de durée de vie de 3,5 ns dans tous les déclins de fluorescence obtenus en plaçant le

filtre optique de bande passante 515-560 nm à l'émission permet de conclure qu'aucune fluorescence significative provenant de la DsRed n'est mesurée dans les expériences de FRET. De même, des mesures de l'autofluorescence cellulaire sur des cellules témoins qui pourraient contribuer à l'apparition d'une durée de vie courte ont aussi été menées et ont prouvé que cette contribution est largement négligeable dans cette étude. Ainsi, la durée de vie courte de la GFP provenant de la co-transfection GFP-p45 et DsRed-MafG correspond bien au transfert d'énergie entre la GFP et la DsRed. Ce FRET est caractéristique de l'interaction spécifique entre p45 et MafG.

V. 1. 2. 2. Interaction de p45 avec un partenaire cytoplasmique

Par la technique du double-hybride, l'équipe de V. Mignotte a caractérisé un partenaire potentiel à p45. Ce partenaire, exprimé en cellule, a une localisation strictement cytoplasmique. Pour des raisons de confidentialité, nous nommerons cette protéine PC (Partenaire Cytoplasmique). Lorsque PC et p45 sont co-exprimées, p45 est alors exclue du noyau et sa localisation devient cytoplasmique. Une des hypothèses consiste à penser que le mécanisme moléculaire impliqué dans cette relocalisation de p45 est l'interaction directe de p45 avec PC. Pour vérifier cette hypothèse, des mesures de déclin de fluorescence de la GFP ont été entreprises pour déterminer la présence de FRET entre GFP-p45 et la protéine PC fusionnée à la DsRed.

La DsRed a été fusionnée en positions N et C-terminale de la PC et la taille des protéines fusions a été vérifiée par la technique de Western. En co-exprimant l'une de ces deux protéines avec GFP-p45, deux situations différentes se présentent : (i) avec DsRed-PC, la fluorescence rouge est strictement cytoplasmique, comme prévu, par contre la localisation de la fluorescence verte provenant de GFP-p45 est exclusivement nucléaire et il n'y a pas de colocalisation de ces deux protéines, et (ii) avec PC-DsRed, il y a colocalisation des deux fluorescences dans le cytoplasme.

C'est donc avec cette dernière construction, en position C-terminale de la PC, que les mesures de déclin ont été menées. Dans toutes les expériences indépendantes effectuées, dans lesquelles la localisation de la fluorescence de la GFP est cytoplasmique, une durée de vie de $0,26 \pm$

0,04 ns ($n = 5$, SD) a été mesurée. La plupart des cellules co-transfectées présentent une localisation cytoplasmique de GFP-p45. Il y a cependant quelques cellules où GFP-p45 reste nucléaire. Un exemple est présenté figure V. 3. considérer

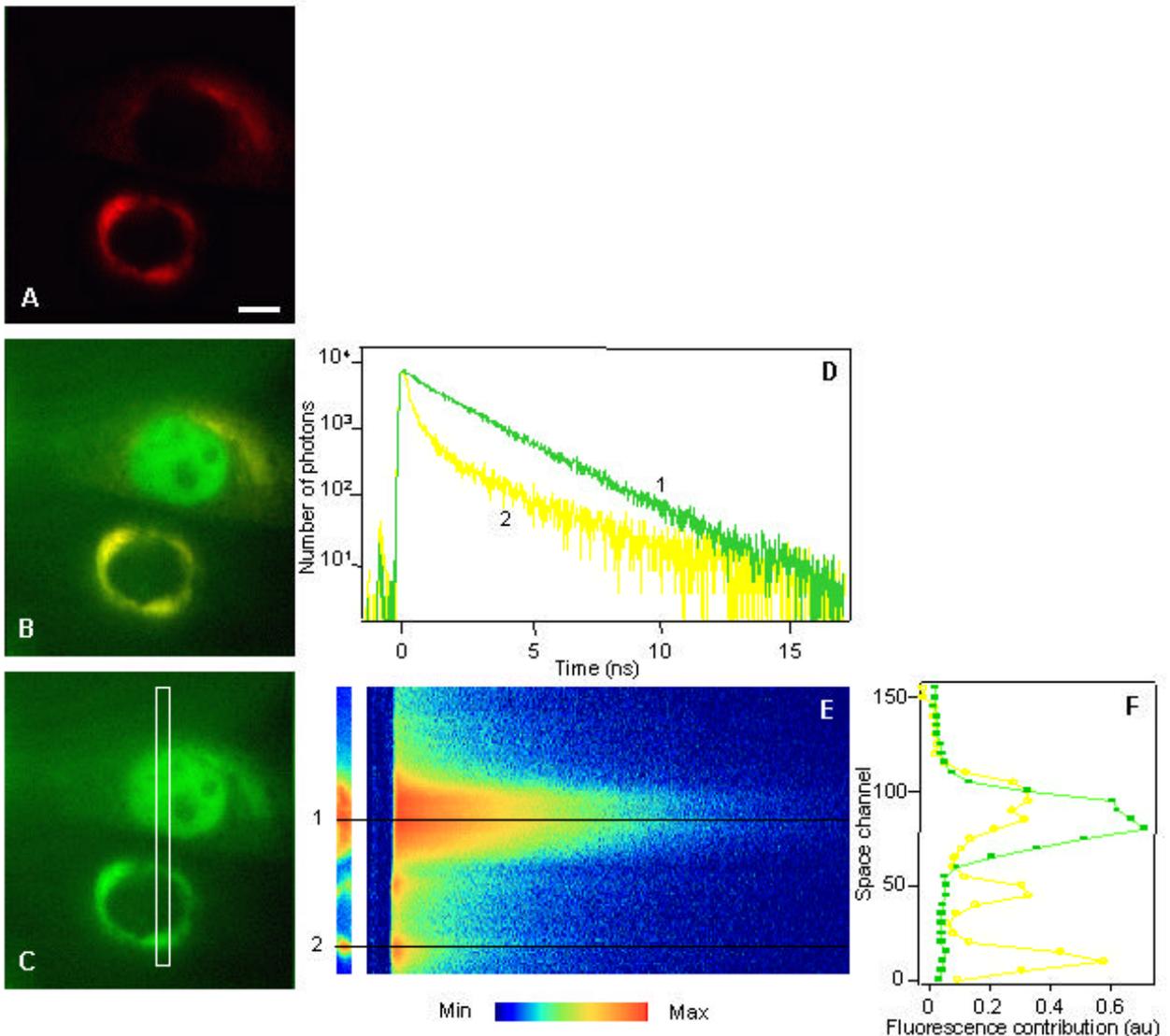


Figure V. 3 : Acquisition DL de la fluorescence de la GFP provenant de deux cellules HeLa co-exprimant GFP-p45 et PC-DsRed.

Les images de fluorescence stationnaire ont été acquises par la caméra CCD à $\lambda_{exc} = 480$ nm et $515 < \lambda_{em} < 560$ nm pour la GFP (C) et $\lambda_{exc} = 540$ nm et $\lambda_{em} > 590$ nm pour la DsRed (A). Une superposition des images est présentée en B. Sur l'image C est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition DL a été menée à $\lambda_{exc} = 480$ nm et $515 < \lambda_{em} < 560$ nm et est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés (E). Deux déclin caractéristiques provenant de la position 1 et de la position 2 localisées sur l'histogramme sont présentés en D. Ce sont les déclin de fluorescence de la GFP mesurés par le DL dans le noyau de la cellule du haut (1) et dans le cytoplasme de la cellule du bas (2). Le résultat de l'analyse globale des 32 déclin obtenus en intégrant 5 canaux par 5 canaux suivant la direction position est présenté en F par les courbes de contribution (coefficients pré-exponentiels) des deux durées de vie : 2,64 ns (vert) et 0,29 ns (jaune). Barre en A = 10 μ m.

Dans une cellule, la localisation de GFP-p45 est cytoplasmique et est colocalisée avec PC-DsRed, dans l'autre cellule, la localisation majoritaire de GFP-p45 est nucléaire, où elle n'est pas colocalisée avec PC-DsRed (cytoplasmique) dont le niveau d'expression est plus faible (Fig. V. 3. A, B et C). L'acquisition DL de ces deux cellules permet de caractériser la situation de FRET et de non-FRET sur le même histogramme 2D (Fig. V. 3. E). Qualitativement, il est possible de voir sur cet histogramme que les déclin de fluorescence dépendent de la localisation spatiale de la fluorescence de la GFP : long déclin pour la cellule du haut (localisation nucléaire) et déclin rapide pour la cellule du bas (localisation cytoplasmique). Ces déclin, pour la position 1 et 2 visualisées sur l'histogramme, sont représentés figure V. 3. D. L'analyse globale correspondant à 32 déclin représentant chacun l'intégration sur cinq canaux spatiaux contigus donne deux durées de vie 2,64 ns et 0,29 ns. Les contributions de ces deux durées de vie (les coefficients pré-exponentiels) en fonction de la position spatiale sont représentées sous la forme de courbes figure V. 3. F. On peut d'ailleurs déduire de ces informations que le déclin 1 de la figure V. 3. D correspond à un déclin mono-exponentiel de durée de vie 2,64 ns et que le déclin 2, lui, correspond à un déclin quasi mono-exponentiel de durée de vie 0,29 ns. Une très faible contribution de la durée de vie longue est résiduelle sur toute la longueur du DL. Pour le déclin 2, l'impression donnée d'une contribution non négligeable de la durée de vie longue est surestimée par l'échelle logarithmique. De fait, les contributions provenant de l'ajustement global permettent de constater que, pour les deux pics jaunes entre le canal 0 et le canal 50 représentés sur la figure V. 3. F et correspondant au cytoplasme de la cellule du bas, la contribution de la durée de vie de 2,64 ns est très proche de zéro (courbe verte du canal 0 au canal 50). Ainsi, on peut proposer que toutes les protéines GFP-p45 dans le cytoplasme de la cellule du bas sont caractérisées par une durée de vie de 0,29 ns, traduisant un transfert d'énergie de la GFP vers la DsRed, ce qui signifie que toute la population de GFP-p45 est en interaction directe avec PC-DsRed. Au contraire, la contribution de la durée de vie de 0,29 ns entre les canaux spatiaux 57-62 (correspondant à la position 1 sur la figure V. 3. E) est presque nulle, traduisant qu'il n'y aurait pas de GFP-p45 en interaction avec PC-DsRed. C'est en accord avec l'absence de fluorescence de DsRed correspondant à ces canaux spatiaux. On peut néanmoins

distinguer une faible fluorescence rouge dans le cytoplasme de la cellule du haut, fluorescence qui est colocalisée avec la fluorescence verte de la GFP-p45. Dans le cytoplasme de cette cellule, la valeur de la durée de vie de fluorescence est de 0,29 ns, ce qui suggère l'existence de FRET pour les canaux 110-115 (cytoplasme de la cellule du haut). Le troisième pic de contribution de la durée de vie de 0,29 ns (canaux spatiaux 70-115) provient probablement d'une fluorescence cytoplasmique de la GFP-p45 hors du plan focal (au-dessus du noyau) puisque cette fluorescence est colocalisée avec de la fluorescence rouge.

La figure V. 4 est un autre exemple de ces expériences.

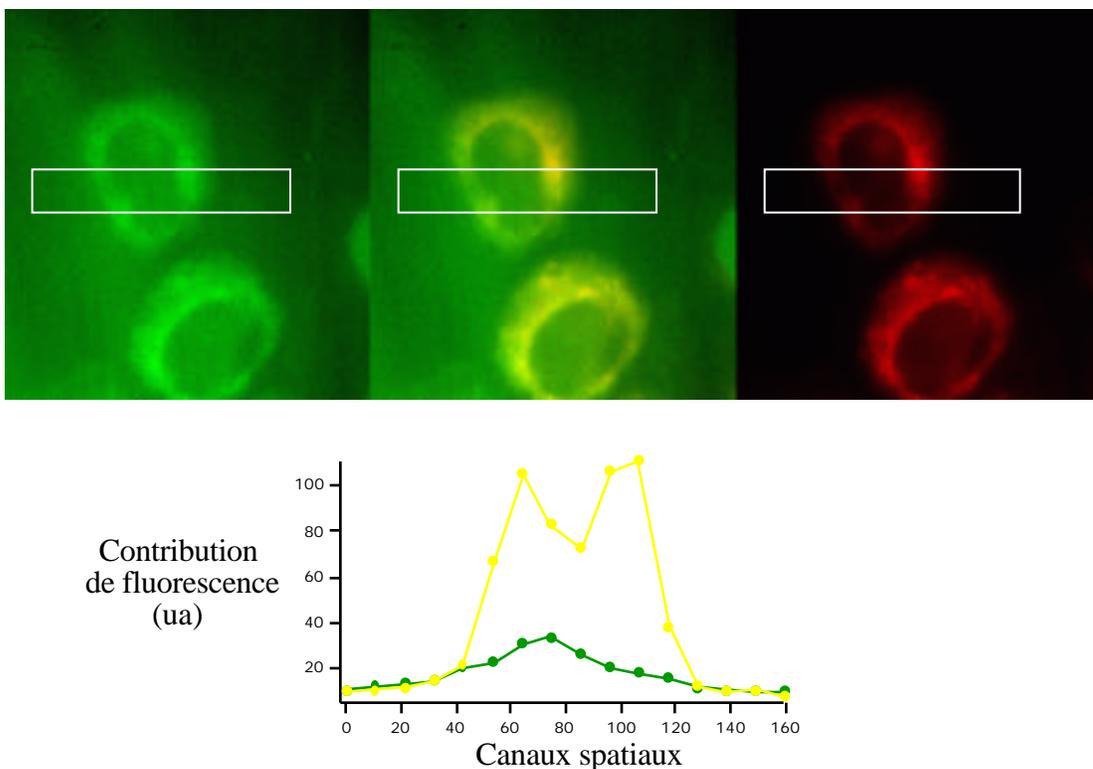


Figure V. 4 : Analyse globale d'une acquisition DL de la fluorescence de la GFP provenant d'une cellule HeLa co-exprimant GFP-p45 et PC-DsRed.

Les images de fluorescence stationnaire ont été acquises par la caméra CCD à $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$ pour la GFP (vert) et $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 590 \text{ nm}$ pour la DsRed (rouge). Une superposition des images est présentée au centre. Sur toutes les images est représentée la surface active du détecteur DL. L'acquisition DL a été menée à $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $515 < \lambda_{em} < 560 \text{ nm}$. Le résultat de l'analyse globale des 16 déclinés obtenus en intégrant 10 canaux par 10 canaux suivant la direction spatiale le long de la surface active du DL est représenté par les courbes de contribution (coefficients pré-exponentiels) des deux durées de vie : 2,91 ns (vert) et 0,26 ns (jaune).

Sur cette figure, ne sont représentées que la colocalisation et les courbes de contribution des durées de vie caractérisées par analyse globale, 2,91 ns et 0,26 ns. De la même manière, dans le cytoplasme,

la contribution de la durée de vie longue est quasi nulle, traduisant le fait que toute la population de GFP-p45 est en interaction avec PC-DsRed. Ce qui est intéressant dans cette analyse, c'est l'apparition d'un faible pic de contribution de la durée de vie de 2,91 ns localisé au niveau du noyau de cette cellule sans qu'il y ait de colocalisation avec de la fluorescence rouge. On peut penser qu'une faible proportion de GFP-p45, indétectable en intensité stationnaire, se trouve localisée dans le noyau et, évidemment générant un signal de fluorescence caractéristique de l'absence de transfert d'énergie.

Les expériences de contrôle présentées dans le chapitre précédent sont aussi valables ici. La durée de vie de ~ 300 ps est caractéristique d'un transfert d'énergie entre la GFP et la DsRed. De plus, les résultats indiquent que la GFP de GFP-p45 transfère une partie de son énergie à la DsRed de PC-DsRed uniquement lorsque GFP-p45 est localisée dans le cytoplasme. Dans certains cas, caractéristiques d'une plus faible expression de PC-DsRed par rapport à l'expression de GFP-p45, GFP-p45 reste localisée dans le noyau. Aucune PC-DsRed n'est en mesure d'interagir avec elle. Les résultats de la co-expression de GFP-p45 avec DsRed-PC, ne faisant pas varier la localisation de GFP-p45, indiqueraient que l'emplacement de la DsRed en position N-terminale de PC empêche l'interaction directe avec p45. D'ailleurs, dans ce cas, les déclinés de fluorescence de la GFP sont mono-exponentiels et la durée de vie est caractéristique de la GFP sans accepteur (2,66 ns). Il semblerait donc que la partie N-terminale de PC soit impliquée dans l'interaction avec p45.

V. 1. 3. Discussion

Le couple de FRET GFP/DsRed a été utilisé ici pour étudier des interactions protéine-protéine directement en cellules vivantes. Les expériences, menées avec le système du DL, ont permis d'étudier la localisation subcellulaire des interactions de GFP-p45 avec son partenaire connu au sein du facteur NF-E2, MafG, et avec un nouveau partenaire, PC, tous deux étiquetés avec le fluorophore accepteur la DsRed. Pour caractériser le FRET entre deux protéines hétérologues co-transfectées, la technique consistant à mesurer la diminution de la durée de vie du donneur ne requiert pas de tenir compte des variations de concentrations de donneurs et d'accepteurs quand

l'inverse est vrai pour des mesures de FRET par intensité stationnaire (voir Ch. II. 2. 4. 1). La diminution de la durée de vie du donneur est comparée avec celle du donneur en absence d'accepteur provenant d'une expérience indépendante. C'est ainsi que la méthode utilisée ici s'est avérée performante pour étudier la localisation subcellulaire des interactions hétérologues entre GFP-p45 et DsRed-MafG et entre GFP-p45 et DsRed-PC. De plus, le fait que ces mesures soient effectuées avec la technique du TCSPC présente deux autres avantages : (i) la très grande sensibilité de la mesure qui permet de détecter et d'identifier de très faibles expressions de protéines fusion, et (ii) la possibilité de déterminer la proportion de protéines (donneuses) en interaction avec son partenaire.

V. 1. 3. 1. Validité des mesures de FRET en utilisant la DsRed

Il a été montré dans la littérature qu'en solution, la DsRed formait des tétramères (Baird et al., 2000, Heikal et al., 2000), observation confirmée par la structure cristallographique (Wall et al., 2000). Il a aussi été rapporté que la DsRed présentait une fluorescence verte en solution avant d'être complètement maturée (Baird et al., 2000). En cellule, la survenue de la tétramérisation de la DsRed fusionnée à une protéine d'intérêt pourrait donc avoir deux effets : (i) une certaine agrégation de la protéine fusion, qui rendrait inopérante cette protéine, tant dans sa localisation éventuelle que dans son étude d'interaction par FRET, ou/et (ii) un éventuel transfert d'énergie entre l'espèce verte et l'espèce rouge de la DsRed, générant une durée de vie courte.

Concernant le premier point, pour certaines protéines fusionnées à la DsRed observées au laboratoire, la localisation n'a pas été conservée. Dans certaines cellules, de nombreuses punctuations fluorescentes rouges correspondant vraisemblablement à de l'agrégation ont été observées. La fusion d'une protéine à la DsRed apparaît moins neutre qu'une fusion à la GFP, par exemple. De nombreux essais de lignées cellulaires stables avec la DsRed, seule ou en fusion se sont avérés infructueux. Il semblerait que l'expression de la DsRed génère un taux de mortalité cellulaire non négligeable. Néanmoins, malgré toutes ces difficultés, pour certaines constructions et dans certaines cellules, la localisation de la protéine paraît conforme à ce qui est attendu. C'est le cas

des protéines DsRed-MafG, PC-DsRed et DsRed-PC étudiées ici. De plus, les interactions entre GFP-p45 et DsRed-MafG et entre GFP-p45 et DsRed-PC semblent bien exister. Il se pourrait que ces interactions soient plus fortes que l'interaction homologue entre les DsRed. Les contrôles menés avec des co-transfections GFP/DsRed non fusionnées ne présentent pas de durée de vie courte (table V. 1). La présence de FRET dans les expériences est bien subordonnée à une interaction spécifique des partenaires d'intérêt.

Concernant le second point, aucune contribution de fluorescence de la DsRed avec le filtre qui sélectionne la fluorescence de la GFP n'a été détectée dans nos contrôles. Soit la protéine DsRed est parfaitement maturée dans les cellules HeLa (48 heures après transfection), soit la contribution verte existe, mais n'est pas significative. Il a d'ailleurs été rapporté que le maximum d'intensité de la fluorescence verte était très faible (Baird et al., 2000). Il est donc très hypothétique de voir apparaître une durée de vie courte d'un transfert de cette espèce fluorescente vers l'espèce rouge au sein d'un tétramère.

En conclusion, la validation du couple de FRET GFP/DsRed et de la technique de déclin de fluorescence pour l'étude des interactions hétérologues de protéines a été montrée ici. On peut espérer que dans un avenir proche des mutants de la DsRed n'ayant pas tendance à s'agréger seront développés, ce qui permettra une généralisation de l'utilisation de ce couple de FRET.

V. 1. 3. 2. Proportion de protéines en interaction et distances mesurées

L'intérêt premier d'utiliser le couple de FRET GFP/DsRed est que le déclin de fluorescence de la GFP peut être considéré comme mono-exponentiel, qu'elle soit fusionnée ou non (voir Ch. IV. 2. 1). Ainsi, en plus de la mise en évidence des interactions p45/MafG et p45/PC en cellules vivantes, l'approche menée permet de caractériser précisément les proportions de protéines en interaction. Les coefficients pré-exponentiels provenant des ajustements correspondent aux proportions des différentes espèces fluorescentes. Dans le cas du FRET, sachant que seule la vitesse non radiative de l'espèce varie, toutes choses égales par ailleurs, le rapport des coefficients pré-exponentiels de l'ajustement bi-exponentiel correspond exactement au rapport des concentrations de

GFP présentant du FRET ou non. Ainsi, de 30 à 70 % de p45, selon les cellules, sont en interaction avec MafG dans le noyau, quand toutes les protéines p45 sont en interaction avec PC dans le cytoplasme.

La modélisation des durées de vie courtes permet aussi de proposer une distance entre les chromophores GFP et DsRed au cours de l'interaction. Pour modéliser ces mesures, il faut bien sûr émettre certaines hypothèses quant à l'orientation et l'organisation spatiale des protéines fusion, le facteur d'orientation, nécessaire à cette modélisation, y étant directement lié (Ch. II. 2. 4. 4). En supposant que la distribution des orientations est aléatoire ($\langle \cos^2 \theta \rangle = 2/3$), les distances mesurées entre la GFP et la DsRed sont de 41 Å pour l'interaction p45/MafG et de 33 Å pour l'interaction p45/PC. Le calcul est effectué en utilisant l'équation II. 2. 13. La caractérisation du R_0 pour le couple GFP/DsRed est présentée chapitre IV. 2. 1. 3. 3. L'hypothèse de la distribution aléatoire des orientations est supportée par l'existence d'une séquence d'une dizaine d'acides aminés entre la protéine d'intérêt et la protéine fluorescente dans ces protéines fusions, ce lien permettant une rotation aléatoire des deux parties de protéine fusion. Cette modélisation ouvre la porte à des études structurales au sein même de la cellule vivante.

V. 1. 3. 3. Interprétation biologique

Bien que considérant le modèle cellulaire HeLa et la transfection transitoire (donnant souvent lieu à une sur-expression) comme imparfait par rapport à la physiologie des interactions mesurées, il est tout de même très intéressant de replacer cette étude dans son contexte de problématique biologique. Le facteur de transcription NF-E2 est constitué de l'hétérodimère formé de p45 et MafG (Igarashi et al., 1994). L'interaction de ces deux protéines a donc été confirmée au sein même du noyau d'une cellule en culture. Il apparaît que ce complexe est indispensable à la thrombopoïèse (Onodera et al., 2000, Shavit et al., 1998, Shivdasani et al., 1995). La caractérisation, en cellule vivante, d'une interaction de p45 avec un partenaire cytoplasmique qui modifierait sa localisation nucléaire est très intéressante dans le contexte de la régulation du facteur de transcription NF-E2.

En perspective, l'utilisation des techniques de déclins de fluorescence s'avérant particulièrement peu perturbante, il serait intéressant de suivre cette interaction lors de la différenciation hématopoïétique. Ceci apporterait une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques de cette interaction.

V. 2. Interaction de protéines homologues

En fusionnant une sous-unité protéique soit avec une protéine fluorescente "donneur" soit avec une protéine fluorescente "accepteur" et après co-expression des deux fusions, on peut révéler, en cellules vivantes, l'interaction de ces protéines homologues (formation d'oligomères) par FRET, que l'on appellera par la suite hétéroFRET. Le même processus de transfert par résonance peut avoir lieu entre chromophores identiques (homoFRET). Dans ce cas, les molécules donneuses et accepteuses n'étant pas spectralement discriminées, la durée de vie ne varie pas. Par contre, ce transfert peut être caractérisé par l'étude de la dépolarisation de la lumière, pour peu que l'orientation des dipôles donneur et accepteur soit différente (Weber, 1954). Avec I. Gautier, au laboratoire, nous avons mené une étude sur la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex type I (TK) pour caractériser sa structure dimérique en cellule vivante. Nous avons associé les deux approches, hétéroFRET et homoFRET. Cette étude avait deux objectifs : (i) la comparaison des deux méthodes et leur efficacité à la caractérisation d'interaction de protéines homologues, et (ii) la caractérisation du dimère de TK et sa relation avec son activité enzymatique dans une étude structure-fonction menée parallèlement par I. Gautier.

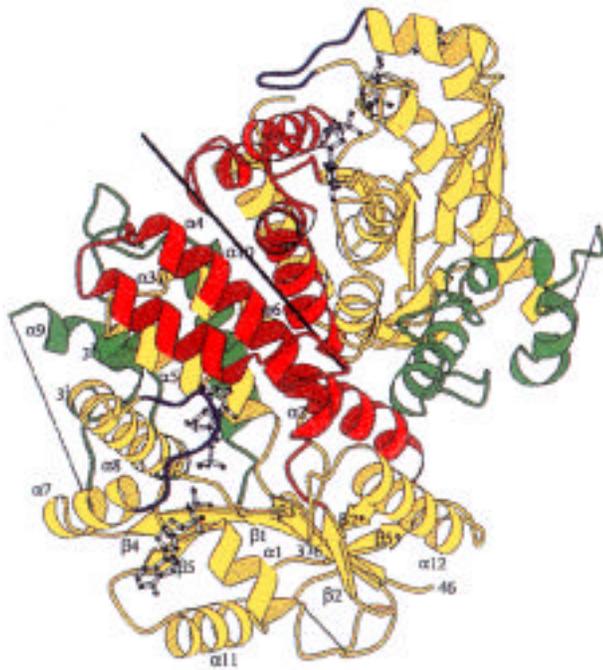
V. 2. 1. La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex type I

L'herpès simplex type-1 (HSV-1) est un *-herpesvirinae*. Ce virus est neurotrope. Il est en effet capable d'infecter les neurones, d'y entrer en latence et de reprendre un cycle répliatif (réactivation). Il est également capable de se répliquer dans les cellules épithéliales et dans les cellules de soutien non neuronales du système nerveux central et périphérique. Les manifestations cliniques de ces virus sont relativement variées. Les plus fréquentes sont des infections orales,

labiales ou génitales. Les infections oculaires, plus rares, peuvent conduire à la cécité. Certaines infections respiratoires pourraient être dues à une primo-infection par un HSV. Les infections neurologiques sont très rares (1 ou 2 personnes sur 1 million), mais en cas d'encéphalite, la mortalité est de 70 %. La contamination du nouveau-né est mortelle dans 50 % des cas. Ces taux de mortalité peuvent être diminués de moitié par l'utilisation des antiviraux (Nahmias et al., 1991). Les antiviraux ont pour cible la thymidine kinase (TK) et la polymérase virales. Ce sont des analogues nucléosidiques qui, phosphorylés par la TK virale, sont incorporés dans l'ADN viral dont ils bloquent la polymérisation. L'affinité moindre de ces analogues pour la TK cellulaire fait de certaines de ces molécules (tels que l'acyclovir et le ganciclovir) des antiviraux efficaces avec une faible toxicité cellulaire.

Le gène de la thymidine kinase code pour une protéine dont la forme majoritaire comprend 376 aa. La TK phosphoryle la déoxythymidine (dT) et la déoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP), ainsi qu'un grand nombre d'analogues nucléosidiques, en transférant le groupe - phosphoryl d'une molécule d'ATP sur le substrat nucléosidique. Les constantes de Michaelis de cette enzyme sont de 0,5 μM pour la thymidine et de 20 μM pour l'ATP (Liu & Summers, 1988). La TK virale est exprimée sous trois formes dans les cellules infectées. La traduction de l'ARNm peut être initiée à partir de trois AUG différents, le deuxième et le troisième AUG étant positionnés à 135 et 177 pb du premier AUG (Haarr et al., 1985, Marsden et al., 1983, Preston & McGeoch, 1981). Les protéines obtenues comprennent 376 aa, 331 aa et 317 aa, leurs poids moléculaires théoriques sont de 43, 39 et 38 kDa respectivement (Haarr & Flatmark, 1987, Marsden et al., 1983, Preston & McGeoch, 1981). La quantité des protéines de 39 et 38 kDa exprimées représente 10 % de la quantité totale de TK exprimée (Irmiere et al., 1989, Marsden et al., 1983). Un signal de localisation nucléaire (SLN) de la TK a été récemment mis en évidence (Degreve et al., 1999, Degreve et al., 1998). Ce signal (RRTALRPRR) est situé entre les résidus 25 et 33 de la protéine de 43 kDa (Degreve et al., 1998), les protéines de 39 et 38 kDa ne contiennent donc pas cette séquence. Ceci est en accord avec le fait que l'activité TK ait été détectée dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules infectées (Haarr & Flatmark, 1987, Herzberg et al., 1981).

Les études menées par cristallographie sur la structure de la thymidine kinase ont été effectuées sur une protéine TK purifiée, délétée des 32 premiers acides aminés (Fetzer et al., 1994). La protéine purifiée a conservé son activité thymidine kinase (K_m de 0,2 μM pour la thymidine). Cristallisée en présence de substrat, la TK forme des homo-dimères (Wild et al., 1997) (Fig. V. 5) qui semblent être la forme active de la protéine (Fetzer et al., 1994, Waldman et al., 1983). La TK est formée d'un cœur central de 5 ou 7 feuillets connectés entre eux par des boucles et de 12 ou 15 hélices (Brown et al., 1995, Folkers et al., 1991, Wild et al., 1995). L'interface entre les monomères est un plan circulaire de 1800 Å^2 , avec une protubérance du résidu tryptophane 310 qui ancre les molécules l'une à l'autre (Brown et al., 1995, Wild et al., 1997). Les structures impliquées dans l'interface sont les hélices 4, 6 et 10, les boucles 2- 3 et 9- 10, et une partie des hélices 2 et 12 (Wild et al., 1995, Wild et al., 1997).



D'après Wild K. et col.,
Protein Science, 1997

Figure V. 5 : Structure cristallographique du dimère de TK.

La TK n'est pas indispensable à la réplication lytique du virus. Les virus de phénotype thymidine kinase négatif se répliquent aussi efficacement que les virus sauvages en cellules

proliférantes. Différentes études menées sur des souris ont cependant montré que la protéine TK était impliquée dans la mise en place de la latence et dans la réactivation.

V. 2. 2. Résultats

En construisant des protéines dans lesquelles les protéines autofluorescentes (XFP) ont été fusionnées à l'extrémité C-terminale de tout ou partie de la protéine TK, en exprimant ces protéines en cellules Vero et en utilisant la microscopie de déclins de fluorescence, nous avons pu déterminer l'état d'oligomérisation, monomère ou dimère, de la TK directement en cellules vivantes. Isabelle Gautier a construit les protéines fusion suivantes dont elle a vérifié l'expression cellulaire par la technique de Western :

- (i) les protéines TK₃₆₆XFP, constituées des aa 1 à 366 de TK suivis de la séquence codant pour une des XFP, puis des aa 367 à 376 de TK (l'XFP est donc en position C-terminale de la TK),
- (ii) les protéines TK_nGFP, constituées de n aa de TK (où n représente les aa 1 à 27 ou 1 à 210 de TK), suivis de la séquence codant pour la GFP, puis des aa 367 à 376 de TK,

V. 2. 2. 1. Interactions mesurées par hétéroFRET

Ces expériences ont consisté à mesurer le transfert d'énergie entre couples de XFP au cours d'une co-transfection de protéines TK respectivement fusionnées au donneur et à l'accepteur.

La distribution subcellulaire des protéines TK₃₆₆XFP est présentée figure V. 6. Les protéines fusion TK₃₆₆CFP, TK₃₆₆GFP et TK₃₆₆YFP ont une distribution subcellulaire identique. La fluorescence est détectée dans le noyau et le cytoplasme des cellules exprimant ces protéines fusion. Le marquage est majoritairement nucléaire. Cette localisation est en accord avec la localisation de la TK révélée par immunofluorescence.

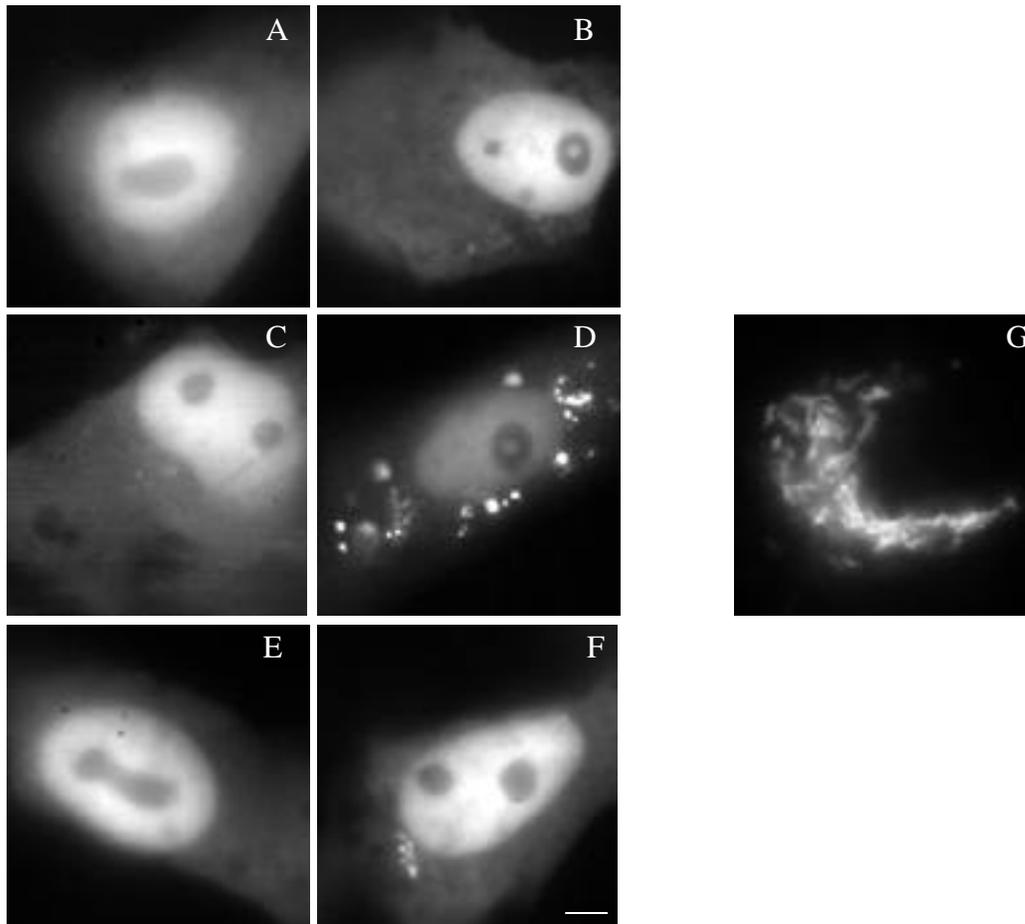


Figure V. 6 : Distribution subcellulaire de la fluorescence des XFP dans les cellules Vero exprimant les protéines TK₃₆₆-XFP.

Les plasmides pTK₃₆₆-CFP (A et B), pTK₃₆₆-GFP (C et D), pTK₃₆₆-YFP (E et F) et pTK₃₆₆-DsRed (G) ont été introduits par transfection dans des cellules Vero et les protéines exprimées ont été détectées par fluorescence. Les cellules A, B, C, D, E et F ont un marquage majoritairement nucléaire avec de la fluorescence également détectée dans le cytoplasme. Des agrégats apparaissent dans les cellules B, D et F. Dans la cellule G, la fluorescence est localisée dans des structures qui pourraient être des mitochondries. Barre en G = 10 µm.

Le gène codant pour ces protéines TK₃₆₆-XFP contient trois sites d'initiation de la traduction correspondant à trois protéines plus ou moins tronquées à leur extrémité N-terminale. La protéine la plus longue, majoritaire, contient un site de localisation nucléaire qui n'est pas présent sur les deux autres formes de protéines. Il est probable que la fluorescence nucléaire corresponde à la forme la plus longue de protéine fusion et que la fluorescence cytoplasmique provienne des deux formes tronquées. Ces images de fluorescence ne permettent pas d'exclure un clivage des protéines fusion puisque la protéine autofluorescente seule se distribue de façon homogène dans les cellules. Dans certaines cellules exprimant les protéines fusion TK₃₆₆-CFP, TK₃₆₆-GFP et TK₃₆₆-YFP, des agrégats

très fluorescents apparaissent deux ou trois jours après la transfection. Le nombre et la taille de ces agrégats augmentent avec le temps après la transfection. La protéine TK₃₆₆DsRed se localise de façon très différente des autres protéines TK₃₆₆XFP. Ceci pourrait être dû à des problèmes de repliement ou de maturation de la protéine fusion qui seraient engendrés par la partie DsRed.

Ainsi, le couple utilisé pour caractériser les interactions homologues éventuelles est le couple CFP/YFP, la protéine fusion TK₃₆₆DsRed ne présentant pas la localisation attendue de la protéine TK. Toutes les mesures ont été effectuées avec le système DL en excitant à 440 nm et en détectant l'émission de fluorescence entre 470 et 500 nm (ce qui permet de sélectionner exclusivement la fluorescence provenant du donneur (CFP) dans les expériences de co-transfection). Les déclin de fluorescence obtenus pour la co-transfection TK₃₆₆CFP / TK₃₆₆YFP varient en fonction du temps après transfection et notamment en fonction de la présence ou non d'agrégats dans la cellule. La figure V. 7 présente une expérience représentative de ce qui est obtenu dans les cellules deux ou trois jours après transfection lorsqu'il y a des agrégats. Les protéines TK₃₆₆CFP et TK₃₆₆YFP sont parfaitement colocalisées dans l'expérience de co-transfection (Fig. V. 7. B, C et D), comme ce qui est attendu. Les deux courbes de la figure V. 7. F représentent les déclin (intégrés sur toute la ligne du DL) de TK₃₆₆CFP exprimée seule (mono-transfection) ou exprimée avec TK₃₆₆YFP (co-transfection), tous deux normalisés à 10000 coups au maximum. Qualitativement, on peut observer que le déclin obtenu pour la co-transfection est plus rapide que celui de la mono-transfection, comme on peut également le visualiser sur les histogrammes 2D en pseudo-couleur. Quantitativement, en effectuant un ajustement global, il n'y a pas de variation significative des durées de vie calculées en fonction de la localisation subcellulaire, que ce soit dans le noyau, le cytoplasme ou pour les agrégats. Cette propriété se vérifie pour toutes les acquisitions effectuées. Les ajustements du déclin total ont été obtenus avec un modèle bi-exponentiel. En effet, le déclin de la CFP exprimée seule ne s'ajuste correctement qu'avec deux durées de vie (Ch. IV. 2. 1. 1. 2).

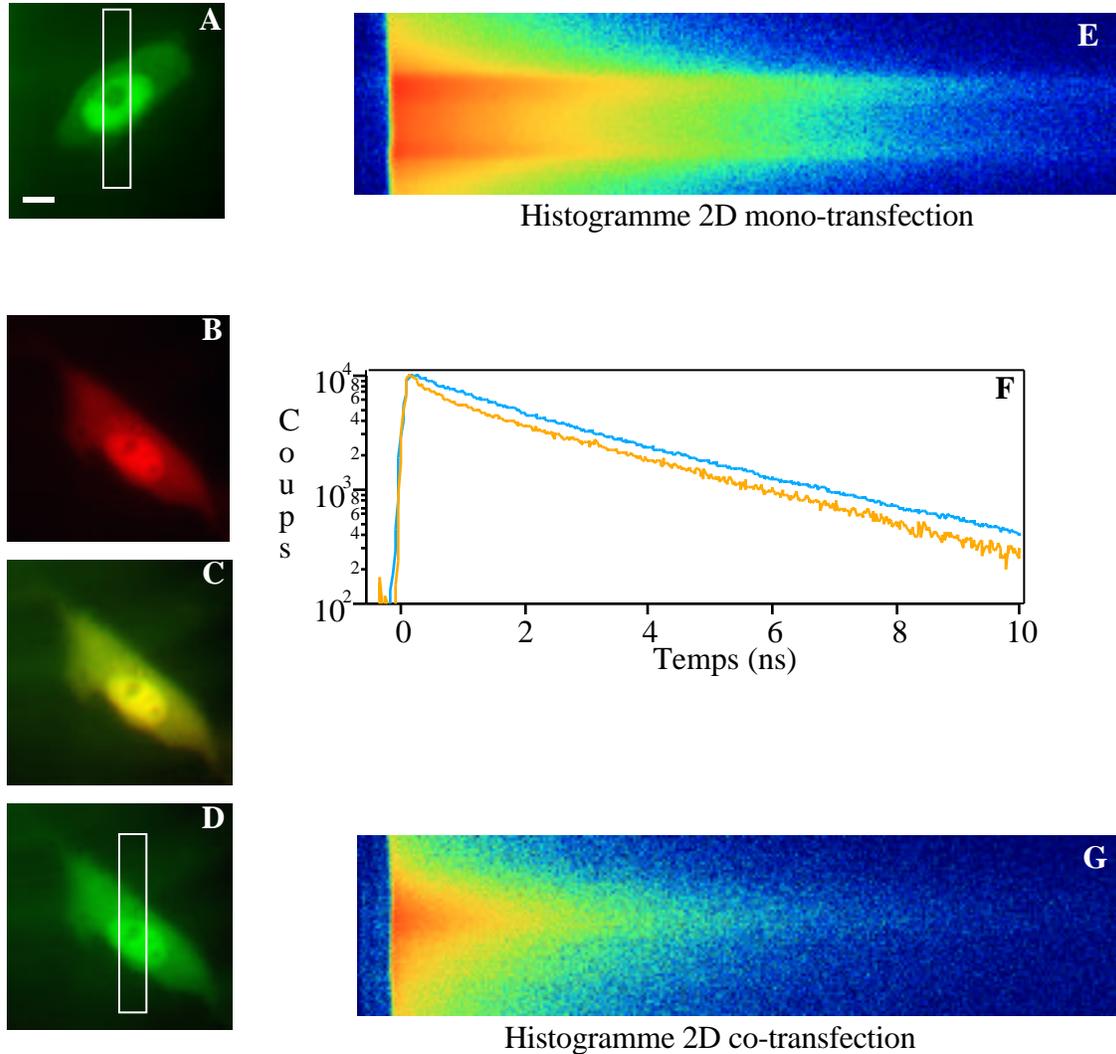


Figure V. 7 : Acquisitions DL de la fluorescence de la CFP provenant de cellules Vero exprimant TK₃₆₆CFP seule et co-exprimant TK₃₆₆CFP et TK₃₆₆YFP.

Les cellules Vero ont été mono-transfectées par le plasmide pTK₃₆₆CFP (A et E) et co-transfectées par les plasmides pTK₃₆₆CFP et pTK₃₆₆YFP (B, C, D et G). Les images de fluorescence stationnaire ont été acquises par la caméra CCD à $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$ et $470 < \lambda_{em} < 500 \text{ nm}$ pour la CFP (A et D) et $\lambda_{exc} = 480 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 510 \text{ nm}$ pour la YFP (B). Une superposition des images B et D est présentée en C. Sur l'image A et D est représentée la surface active du détecteur DL. Les acquisitions DL ont été menées à $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$ et $470 < \lambda_{em} < 500 \text{ nm}$ et chacune d'elle est représentée par l'histogramme 2D (temps et position) des photons comptés (E et G). L'intégrale simple en fonction de la position de ces histogrammes correspond au nombre de photons comptés en fonction du temps et est représentée sous la forme d'une courbe (F), verte pour la mono-transfection et jaune pour la co-transfection. Ce sont les déclinés de fluorescence totaux de la GFP mesurés par le DL dans ces deux situations. Barre en A = 10 μm .

Dans les expériences de la figure V. 7, la TK₃₆₆CFP exprimée seule dans la cellule a ainsi des durées de vie de 3,51 et 1,23 ns avec des contributions de 59,5 % et 40,5 % respectivement. La TK₃₆₆CFP co-exprimée avec la TK₃₆₆YFP a des durées de vie de fluorescence de 3,64 et 0,65 ns

avec des contributions respectives de 52,3 et 47,7 %. En première approximation, nous calculons une durée de vie moyenne de la TK₃₆₆CFP en tenant compte des contributions des deux durées de vie (Eq. IV. 2. 1). La TK₃₆₆CFP exprimée seule a une durée de vie de fluorescence moyenne de 2,59 ns. Quand elle est exprimée avec TK₃₆₆YFP, sa durée de vie moyenne est de 2,21 ns. Cette diminution de la durée de vie de fluorescence est caractéristique du transfert d'énergie de la CFP vers la YFP. En utilisant donc le couple CFP/YFP en hétéroFRET pour caractériser des interactions homologues, il paraît extrêmement difficile de modéliser correctement le phénomène, les résultats obtenus sont plus qualitatifs que quantitatifs. En supposant qu'il existe deux situations distinctes, FRET et non-FRET, dans les expériences de co-expression de TK₃₆₆CFP et TK₃₆₆YFP et que les deux espèces de TK₃₆₆CFP caractérisées par les deux durées de vie soient impliquées dans le transfert vers la YFP, le déclin de fluorescence obtenu correspondrait théoriquement à quatre exponentielles. Or, il est extrêmement difficile de discriminer quatre durées de vie distinctes dans un déclin, pour peu que ces durées de vie soient proches.

Pour la CFP, les spectres d'absorption et d'émission des deux espèces correspondant aux deux durées de vie pourraient être différents (voir Ch. IV. 2. 1. 1. 2). À une même distance et pour une même orientation respective, les vitesses de transfert entre ces deux espèces et la YFP seraient alors différentes, conséquence de la différence de R_0 . Une des deux espèces pourrait transférer plus efficacement son énergie à la YFP. De plus, dans le cas du dimère de TK, les deux espèces de CFP sont susceptibles de transférer leur énergie entre elles. Ce transfert a une incidence directe sur le déclin, la durée de vie de chaque espèce étant différente. Ainsi, prenant en compte ces différents phénomènes, il paraît bien difficile de présenter un modèle discret de plusieurs durées de vie caractérisant le phénomène d'hétéroFRET dans les dimères. Aussi, a-t-on trouvé un ajustement bi-exponentiel satisfaisant pour toutes les situations.

Les différents résultats des ajustements des différentes données expérimentales sont présentés table V. 2.

Table V. 2 : Paramètres cinétiques de fluorescence des mono et co-transfection TK₃₆₆CFP et TK₃₆₆ YFP.

Protéine	Jour après		τ ₁ (ns)		τ ₂ (ns)		< > (ns)
	transfection	Agrégats		a ₁		a ₂	
TK ₃₆₆ CFP	J ₁	-	4,10	0,40	1,38	0,60	2,46
TK ₃₆₆ CFP	J ₁	-	4,40	0,35	1,60	0,65	2,58
TK ₃₆₆ CFP	J ₁	-	4,26	0,40	1,51	0,60	2,61
TK ₃₆₆ CFP	J ₂	-	4,10	0,35	1,36	0,65	2,30
TK ₃₆₆ CFP	J ₂	-	3,54	0,56	1,12	0,44	2,47
TK ₃₆₆ CFP	J ₂	-	3,54	0,60	1,06	0,40	2,54
TK ₃₆₆ CFP	J ₂	+	4,29	0,35	1,34	0,65	2,37
TK ₃₆₆ CFP	J ₂	+	4,40	0,45	1,27	0,55	2,68
TK ₃₆₆ CFP	J ₃	++	3,45	0,57	1,07	0,43	2,43
TK ₃₆₆ CFP	J ₃	++	3,52	0,59	1,23	0,41	2,58
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₁	-	4,32	0,40	1,41	0,60	2,58
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₁	-	4,71	0,35	1,69	0,65	2,75
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₁	-	4,33	0,40	1,52	0,60	2,64
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₂	-	3,46	0,55	1,04	0,45	2,38
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₂	+	3,60	0,55	0,94	0,45	2,41
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₂	+	3,42	0,58	1,03	0,42	2,42
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₂	+	4,44	0,35	1,58	0,65	2,58
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₂	+	4,04	0,45	1,20	0,55	2,48
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₂	+	3,77	0,40	0,95	0,60	2,08
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₂	++	3,79	0,45	0,97	0,55	2,24
TK ₃₆₆ CFP / TK ₃₆₆ YFP	J ₃	++	3,64	0,52	0,65	0,48	2,21

Le paramètre important permettant de comparer ces différentes données est < >, la durée de vie moyenne. Pour ce paramètre, quelles que soient les conditions cellulaires d'acquisition de la mono-transfection TK₃₆₆CFP, < > ne varie pas significativement et on a < > = 2,50 ± 0,12 ns (SD, n = 10). Par contre, concernant les résultats de co-transfections, une diminution de cette durée de vie moyenne est observée pour trois mesures indépendantes, < > = 2,18 ± 0,09 ns (n = 3). Cette diminution est corrélée au nombre de jours après transfection et à l'apparition d'agrégats cellulaires.

Il est à noter que pour ces cellules, la présence d'hétéroFRET est détectée non seulement dans les agrégats mais aussi en dehors, dans le cytoplasme et le noyau de ces cellules.

V. 2. 2. 2. Interactions mesurées par homoFRET

Une autre méthode pour caractériser les interactions homologues a été entreprise en mesurant les déclin d'anisotropie de fluorescence des protéines fusion GFP avec tout ou partie de la TK. Les paramètres cinétiques de ces déclin d'anisotropie permettent (i) de contrôler le comportement rotationnel de la protéine et (ii) de mesurer l'homoFRET potentiel pour étudier les interactions macromoléculaires entre protéines identiques. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Tramier et al., 2001). Les déclin d'anisotropie sont mesurés comme décrit chapitre IV. 1. 2 avec le système confocal.

V. 2. 2. 2. 1. Diffusion rotationnelle des protéines fusion GFP

La mesure des déclin d'anisotropie de la GFP seule en solution et en cellules a déjà été abordée chapitre IV. 2. 1. 4. Ici, il s'agit de mesurer de manière identique les déclin d'anisotropie de protéines fusion GFP. La GFP est un bon marqueur pour ces études. Son déclin de fluorescence peut être assimilé à une mono-exponentielle et permet ainsi une modélisation simple des déclin d'anisotropie. De plus, il n'existe pas de mouvements locaux du chromophore GFP dans sa poche protéique, ce que nous avons confirmé par l'absence de dépolarisation rapide dans les déclin d'anisotropie de la GFP seule (Ch. IV. 2. 1. 4).

Les mesures d'anisotropie ont été effectuées sur les protéines TK₂₇GFP, TK₂₁₀GFP et TK₃₆₆GFP dans le noyau et le cytoplasme de cellules Vero exprimant ces protéines après transfection. Les localisations subcellulaires de ces protéines et de la GFP seule sont présentées figure V. 8. La protéine TK₂₁₀GFP présente une distribution majoritairement nucléaire. De la fluorescence est également détectée dans le cytoplasme. Cette distribution est identique à celle de la protéine TK₃₆₆GFP, alors que la fluorescence des protéines GFP et TK₂₇GFP est détectée de façon diffuse dans les cellules, sans localisation préférentielle. Le gène codant pour la protéine TK₂₁₀GFP, comme celui codant pour la protéine TK₃₆₆GFP, contient trois sites d'initiation de la traduction.

Seule la protéine initiée sur le premier site contient un signal de localisation nucléaire. Celle-ci serait donc détectée dans le noyau, les deux autres protéines se localisant dans le cytoplasme.

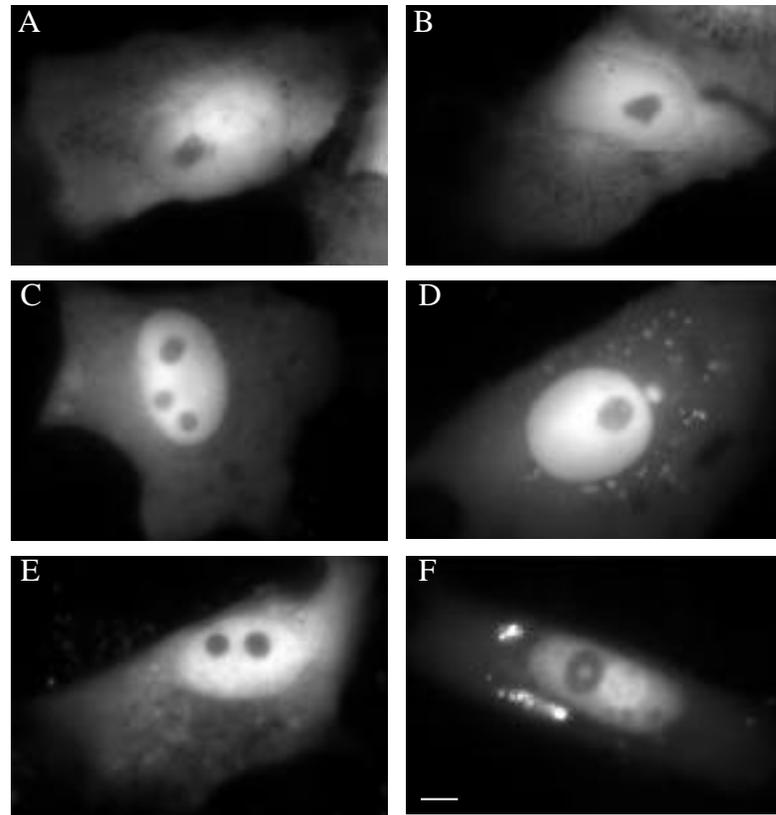


Figure V. 8 : Distribution subcellulaire de la fluorescence de la GFP dans les cellules Vero exprimant les protéines TK_nGFP.

Les plasmides pEGFP-C1 (Clontech), pTK₂₇GFP, pTK₃₆₆GFP et pTK₂₁₀GFP ont été introduits par transfection dans des cellules Vero et les protéines exprimées ont été détectées par fluorescence. A : cellule exprimant la GFP ; B : cellule exprimant la TK₂₇GFP ; C et D : cellules exprimant la TK₃₆₆GFP un et trois jours post-transfection, respectivement ; E et F : cellules exprimant la TK₂₁₀GFP un et trois jours post-transfection, respectivement. Les cellules A et B ont une fluorescence diffuse, sans localisation préférentielle. Dans les cellules C et E, la localisation des protéines fusion est majoritairement nucléaire. Des agrégats très fluorescents sont présents dans les cellules D et F, la localisation des protéines fusion dans ces cellules étant par ailleurs identique à celle des cellules C et E. Barre en F = 10 μ m.

Dans certaines cellules exprimant la protéine TK₂₁₀GFP, on détecte des agrégats verts très brillants, comme dans les cellules exprimant la TK₃₆₆GFP. Le nombre et la taille de ces agrégats augmentent en fonction du temps après la transfection. 24 heures après la transfection, il n'y a pas d'agrégats, 48 heures après, certaines cellules présentent des agrégats et trois jours après, presque toutes les cellules ont des agrégats dont la taille est plus importante. Les déclin d'anisotropie sont mono-

exponentiels pour la TK₂₇GFP ainsi que pour la TK₂₁₀GFP et la TK₃₆₆GFP dans les cellules ne contenant pas d'agrégats. De la même manière que pour la GFP seule (Ch.IV. 2. 1. 4), les temps caractéristiques de relaxation d'anisotropie ne sont pas significativement différents dans le noyau et le cytoplasme. Les résultats des ajustements des déclin d'anisotropie effectués 24 heures après les diverses transfections sont présentés table V. 3.

Table V. 3 : Paramètres cinétiques de déclin d'anisotropie de la TK₂₇GFP, TK₂₁₀GFP et TK₃₆₆GFP en cellules vivantes, 24 heures post-transfection.

Protéine	Nombre		Poids moléculaire		
	d'expériences	(ns)	r ₀	(ns)	théorique (kDa)
TK ₂₇ GFP	6	2,62 ± 0,09	0,27 ± 0,02	35,6 ± 8,6	32
TK ₂₁₀ GFP	5	2,57 ± 0,05	0,25 ± 0,02	54,6 ± 4,2	52
TK ₃₆₆ GFP	3	2,64 ± 0,10	0,26 ± 0,01	81,0 ± 15,3	70

Ces paramètres sont caractéristiques des temps de rotation des protéines fusion complètes considérées comme une sphère. La figure V. 9 montre que le temps de rotation mesuré par cette méthode est proportionnel aux poids moléculaires attendus pour ces protéines.

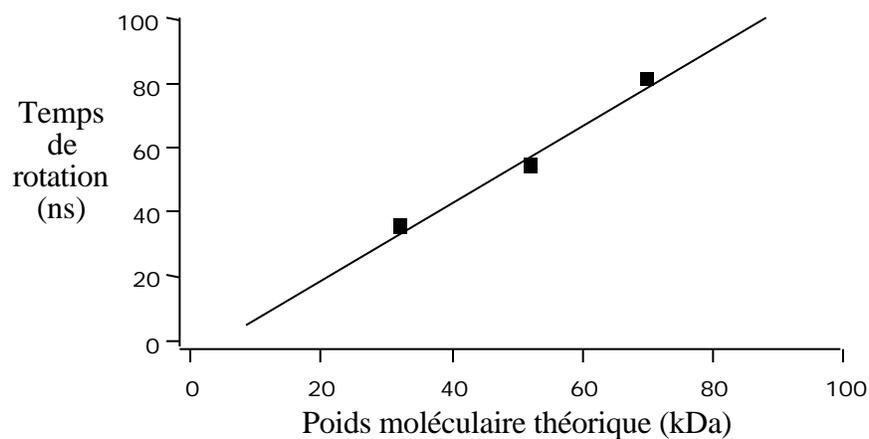


Figure V. 9 : Ajustement linéaire des temps de rotation des protéines TK_nGFP en cellules vivantes en fonction de leurs poids moléculaires théoriques.

La droite représente l'ajustement linéaire des données expérimentales (carrés pleins) provenant de la table V. 3.

La fluorescence observée dans le noyau et le cytoplasme des cellules transfectées avec le plasmide contenant les gènes des protéines fusion ne provient donc pas de GFP clivée et permettent d'identifier la forme monomérique de ces protéines fusion. De plus, ces déclin tendent vers zéro aux temps longs ce qui signifie que la rotation des protéines n'est pas gênée et que les protéines ne sont pas en interaction avec des composants subcellulaires.

V. 2. 2. 2. 2. HomoFRET et interactions homologues

La figure V. 10 compare les déclin d'anisotropie de la TK₂₇GFP et de la TK₃₆₆GFP à différents temps post-transfection. Les courbes présentent bien un déclin mono-exponentiel pour la TK₂₇GFP et pour la TK₃₆₆GFP dans les cellules ne contenant pas d'agrégats i. e. 24 heures post-transfection en ce qui concerne la TK₃₆₆GFP (Fig. V. 10. a et c). Au contraire, dans les cellules contenant des agrégats (deux ou trois jours après la transfection), le déclin d'anisotropie de la TK₃₆₆GFP est très différent (Fig. V. 10. b) et ceci que l'acquisition provienne des agrégats ou de la fluorescence diffuse de ces cellules.

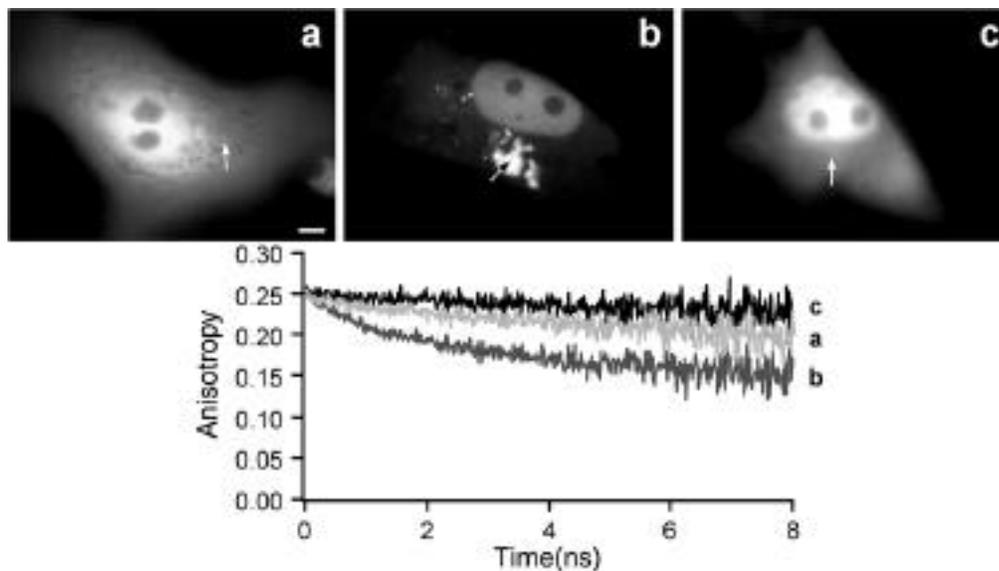


Figure V. 10 : Déclin d'anisotropie de fluorescence subcellulaire des protéines TK₂₇GFP et TK₃₆₆GFP.

Haut : Images de fluorescence stationnaire de cellules Vero exprimant TK₂₇GFP (a) et TK₃₆₆GFP 24 heures et 72 heures post-transfection (c et b). a et c : cellules présentant seulement une fluorescence cytoplasmique et nucléaire diffuse ; b : cellule contenant des agrégats fluorescents. Bas : Dépendance temporelle de la dépolarisation de fluorescence mesurée par le système confocal provenant du cytoplasme diffus (a et c) et provenant des agrégats (b) à $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 515 \text{ nm}$. Les déclin de fluorescence utilisés pour le calcul de la fonction d'anisotropie ont été normalisés par la méthode de normalisation expérimentale présentée chapitre IV. 1. 2. 1. La localisation subcellulaire du volume illuminé ($1 \mu\text{m}^3$) à partir de laquelle les déclin d'anisotropie ont été mesurés est indiquée par une flèche. Barre en a = $5 \mu\text{m}$.

L'ajustement de ce déclin requiert un modèle bi-exponentiel du type

$$r(t) = r_0 [b \exp(-t/\tau_1) + (1-b) \exp(-t/\tau_2)] \quad (\text{V. 2. 1})$$

avec $\tau_1 = 2,4 \text{ ns}$, $\tau_2 > 200 \text{ ns}$ et $b = 0,37$. Des déclin d'anisotropie identiques ont été aussi mesurés pour la TK₂₁₀GFP (Fig. V. 11). Les différents résultats obtenus de ces ajustements se résument à $\tau_1 = 2,4 \pm 0,3 \text{ ns}$ et $b = 0,37 \pm 0,02$ avec $\tau_2 > 200 \text{ ns}$ (SD, n = 3) pour la TK₃₆₆GFP et $\tau_1 = 2,1 \text{ ns}$ et $b = 0,52$ avec $\tau_2 > 200 \text{ ns}$ pour la TK₂₁₀GFP.

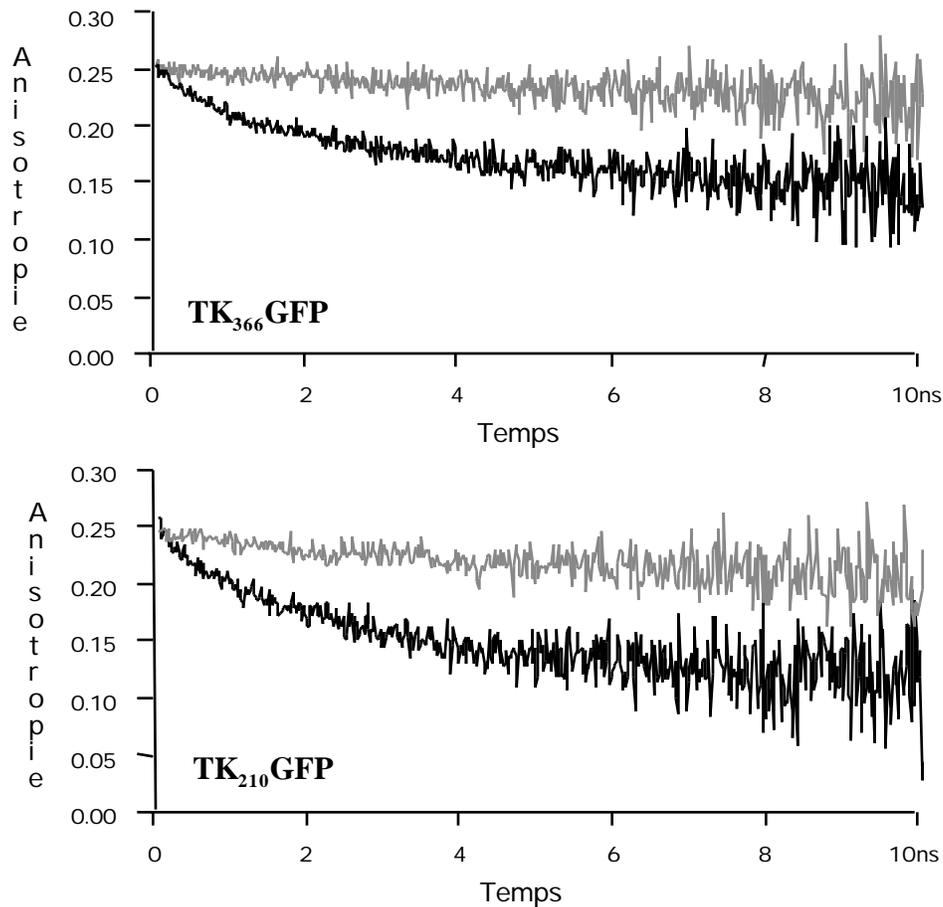


Figure V. 11 : Différents déclin d'anisotropie de fluorescence des protéines TK₂₁₀GFP et TK₃₆₆GFP dans les cellules contenant (3 jours post-transfection) ou ne contenant pas d'agrégats fluorescents (24 heures post-transfection). Les courbes claires proviennent de cellules ne contenant pas d'agrégats (un jour après transfection), les courbes foncées proviennent de cellules contenant des agrégats (trois jour après transfection). Les déclin d'anisotropie ont été mesurés par le système confocal à $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 515 \text{ nm}$. Les déclin de fluorescence utilisés pour le calcul de la fonction d'anisotropie ont été normalisés par la méthode de normalisation expérimentale présentée chapitre IV. 1. 2. 1.

Le temps court de relaxation d'anisotropie (τ_1) ne peut correspondre à un mouvement rotationnel, car, si la GFP avait été clivée dans les agrégats par exemple, ce temps de rotation aurait été de 23 ns (Ch. IV. 2. 1. 4). Il ne correspond pas non plus à un mouvement local du chromophore au sein de la protéine pour deux raisons : (i) ce temps aurait été observé dans tous les déclin d'anisotropie de la GFP, et (ii) ce mouvement local du chromophore aurait vraisemblablement induit une variation de la durée de vie de fluorescence. Par des mouvements de courbure de la région peptidique entre les deux moitiés de protéines (TK et GFP) résulterait un mouvement local de la GFP entière par rapport à la TK. Le temps de rotation observé serait plus long que 2,1 ou 2,4 ns (Hink et al., 2000) et serait aussi observé avec les déclin d'anisotropie des monomères. Ce temps court de dépolarisation de la lumière est typique du transfert d'énergie entre chromophores identiques. L'homo-transfert ne change pas les propriétés spectrales et les durées de vie de la fluorescence émise, mais conduit à la dépolarisation de la lumière (Weber, 1954). Il est probable que cet homo-transfert entre les chromophores de GFP reflète la formation de dimères de TK₂₁₀GFP et TK₃₆₆GFP. Il n'est pas possible de discriminer entre un temps de rotation très long (de l'ordre de 200 ns) et une valeur infinie pour τ_2 dans nos conditions. En effet, comparés à la durée de vie de la GFP, ces temps de relaxation très longs ne sont plus discriminables. La valeur de τ_2 pourrait aussi bien être interprétée comme l'anisotropie résiduelle dans un contexte de migration d'énergie entre deux chromophores GFP, comme cela est présenté chapitre II. 3. 4.

En conclusion, ce très court temps de relaxation montre sans équivoque qu'il existe un homo-transfert entre deux GFP, caractérisant donc une interaction entre protéines TK₃₆₆GFP, ainsi qu'entre protéines TK₂₁₀GFP. Il est possible, de plus, de modéliser les déclin d'anisotropie pour tenter de déterminer plus précisément l'organisation macromoléculaire de ces protéines.

V. 2. 2. 2. 3. Modélisation de l'homoFRET pour un dimère TK-GFP

Pour rendre compte de la dépolarisation partielle par homoFRET, il s'agit de considérer un modèle dans lequel après un ou plusieurs sauts d'énergie, la fluorescence émise demeure anisotrope. Ici, pour interpréter ces résultats expérimentaux, un modèle de dimère de TK-GFP a été

utilisé. Il est évident que ce modèle n'est pas exclusif, les données pourraient également être interprétées comme une migration d'énergie dans un oligomère de plus haut poids moléculaire dont les fluorophores auraient des orientations privilégiées. Par contre, une distribution au hasard des fluorophores provoquerait une dépolarisation totale de la fluorescence. Ce modèle de dimère est supporté par l'hypothèse de la formation de dimères de TK présenté en introduction. C'est donc dans ce cadre que les données expérimentales montrant l'interaction homologue entre TK₃₆₆GFP et entre TK₂₁₀GFP respectivement ont été modélisées.

Le modèle est présenté en détail chapitre II. 3. 4. Lorsqu'il y a transfert d'énergie entre deux chromophores identiques comme décrit dans ce modèle, l'anisotropie de fluorescence, $r(t)$, est corrélée à la vitesse de transfert, k , et à l'orientation mutuelle entre les deux chromophores, θ , selon l'équation II. 3. 25 :

$$r(t) = 1/10[(3 - 3\cos^2 \theta) e^{-2kt} + 3\cos^2 \theta + 1] \quad (\text{V. 2. 2})$$

Cette équation est reliée à plusieurs hypothèses :

- (i) la rotation du dimère de protéines pendant la durée de vie de fluorescence est négligeable, ce qui est le cas pour les dimères de TK₃₆₆GFP et de TK₂₁₀GFP en cellules vivantes. En effet, le temps de rotation du monomère a été estimé respectivement à 81,0 ns et 54,6 ns, ce qui donnerait une valeur supérieure à 100 ns pour la rotation du dimère. Sachant que le processus de désexcitation de la GFP est bien plus rapide ($\tau = 2,6$ ns), il n'est pas possible de discriminer entre la rotation du dimère et une molécule immobile ;
- (ii) il n'existe pas de réorientation entre les moments de transition des états excités initialement et secondairement par transfert pendant le temps de la fluorescence (modèle statique). Cette hypothèse se vérifie pour les dimères TK₃₆₆GFP et de TK₂₁₀GFP à partir du moment où le chromophore GFP est rigidement fixé à l'intérieur du tonneau protéique (Ch. IV. 2. 1. 4) et qu'aucun mouvement de la partie GFP par rapport à la TK n'a été mesuré dans les déclins d'anisotropie des monomères ;
- (iii) les monomères du dimère de TK sont bien identiques, sachant qu'ils proviennent d'un même plasmide recombinant. Il est donc très probable que l'orientation des deux GFP est symétrique dans le dimère.

Le fait qu'une unique vitesse de transfert ait été obtenue s'accorde bien avec l'argument qu'il n'existe qu'une seule configuration de dimère. Le modèle présenté semble donc une bonne approximation pour décrire les résultats bien que l'on ne puisse exclure l'existence d'une distribution de vitesse. Les paramètres physiques obtenus à partir de l'équation V. 2. 2 pour différentes expériences sont présentés table V. 4.

Table V. 4 : Paramètres physiques du transfert d'énergie entre chromophores GFP pour les dimères TK₃₆₆GFP et TK₂₁₀GFP en cellules vivantes.

Protéine	(degrés)	(ns ⁻¹)	R _{max} (Å)
TK ₃₆₆ GFP	44,6	0,208	70,2
TK ₃₆₆ GFP	43,8	0,185	71,6
TK ₃₆₆ GFP	46,1	0,238	68,6
TK ₂₁₀ GFP	56,4	0,238	68,6

À partir de l'anisotropie résiduelle, correspondant à $(1 - b) r_0$, l'angle correspondant à l'orientation mutuelle entre les deux chromophores a été calculé. À partir de la vitesse de transfert, k , la distance entre les deux chromophores, R, peut être calculée si le facteur orientationnel, $\langle \cos^2 \theta \rangle$, est connu (Eq. II. 3. 26 et II. 3. 27). $\langle \cos^2 \theta \rangle$ dépend de l'orientation mutuelle entre les deux dipôles de transition, θ , mais aussi de l'orientation respective de chaque dipôle avec l'axe joignant les deux chromophores (Eq. II. 3. 27). Cette dernière orientation est inconnue. La valeur présentée dans la table V. 4, R_{max}, correspond à la limite supérieure de R en prenant $\langle \cos^2 \theta \rangle = 4$ comme majoration de ce facteur et en calculant R₀ comme présenté chapitre IV. 2. 1. 3. 4 avec cette valeur de $\langle \cos^2 \theta \rangle$. Les valeurs maximales de R présentées sont compatibles avec la structure dimérique de la TK obtenue en cristallographie. En effet, dans le dimère cristallisé de TK, les deux extrémités C-terminale sont séparées de 47 Å (G. E. Schulz, communication personnelle).

V. 2. 3. Discussion

L'existence de FRET entre protéine TK₃₆₆CFP et TK₃₆₆YFP et d'homoFRET pour la protéine TK₃₆₆GFP montre qu'il existe bien une interaction homologue pour la construction TK₃₆₆XFP. Néanmoins, pour caractériser plus précisément la structure macromoléculaire dans laquelle cette interaction est impliquée, les deux approches ne sont pas équivalentes. Nous comparerons donc les résultats de ces deux techniques. Dans un second temps, nous discuterons de ces résultats dans le cadre d'une étude structure – activité en cellules vivantes menée avec Isabelle Gautier.

V. 2. 3. 1. Comparaison hétéroFRET–homoFRET pour la caractérisation d'interactions homologues

Les résultats obtenus par hétéroFRET sont plus qualitatifs que quantitatifs dans le cas du couple CFP/YFP au contraire des résultats d'anisotropie dont la modélisation permet de proposer une interprétation structurale du complexe où prend place l'interaction avec l'homologue. La comparaison générale que l'on peut faire des deux approches s'appuie sur différentes observations. Premièrement, dans les expériences d'hétéroFRET, les dimères sont sous la forme CFP-CFP, CFP-YFP et YFP-YFP. Puisque c'est la fluorescence du donneur que l'on mesure, les dimères CFP-CFP et CFP-YFP participent au déclin de fluorescence mesuré minimisant ainsi la contribution de l'espèce dont la durée de vie est diminuée par hétéroFRET (CFP-YFP). Cet aspect ne concerne pas l'étude de l'homoFRET par déclin d'anisotropie qui ne met en jeu que des dimères identiques.

Deuxièmement, dans le cas où l'on est capable de mesurer la vitesse de transfert, l'hétéroFRET ne mesure qu'une distance entre le donneur et l'accepteur. Une information supplémentaire est contenue dans l'étude de l'homoFRET par déclin d'anisotropie. Si la vitesse de dépolarisation est corrélée à la vitesse de transfert et correspond à la distance, l'anisotropie résiduelle renseigne sur les différentes orientations mutuelles des chromophores impliqués dans le transfert. Cette information apparaît essentielle lorsqu'il s'agit de modéliser les données expérimentales.

Troisièmement, concernant les protéines fusions avec les GFP et variants spectraux, la vitesse de dépolarisation impliquant un transfert d'énergie mesurée par anisotropie est très rapidement différente des vitesses de dépolarisation impliquant la rotation totale ou locale de la protéine, même pour une efficacité de transfert faible, ce qui diffère des durées de vie mesurées pour le FRET. À titre d'exemple, considérons une efficacité de transfert faible de 10 %, soit $E = 0,1$. Pour la GFP, la durée de vie de fluorescence du donneur seul est $\tau_D = 2,6$ ns ce qui, selon l'équation II. 2. 12, donnerait $\tau_{DA} = 2,34$ ns, la durée de vie du donneur en présence d'accepteur dans une expérience d'hétéroFRET. Pour la vitesse de transfert ($k_T = E / \tau_{DA}$), on a alors $k_T = 0,043$ ns⁻¹. Dans les expériences de déclin d'anisotropie, le temps de relaxation ($\tau = 1/2$) serait alors de 11,7 ns. Le temps de rotation de la protéine fusion GFP au minimum correspond à 23 ns (le temps de rotation de la GFP seule en cellule). Il apparaît bien qu'il est plus facile expérimentalement de discriminer 11,7 ns de 23 ns dans un déclin d'anisotropie que de discriminer 2,34 ns de 2,6 ns dans un déclin de fluorescence, sachant de plus qu'une fraction seulement des donneurs ont une durée de vie plus courte puisque l'on est en présence d'homodimères donneur/donneur et donneur/accepteur. Ainsi, il semble possible de mesurer expérimentalement de bien plus faibles efficacités de transfert par anisotropie que par hétéroFRET.

Enfin, l'anisotropie, qui mesure également la diffusion rotationnelle des protéines, peut également permettre de caractériser des interactions macromoléculaires autres que l'interaction homologue recherchée qui gêneraient les mouvements de rotation. Au contraire, l'hétéroFRET ne caractérise que l'interaction recherchée.

Plus particulièrement, à cause des deux durées de vie de la CFP, l'utilisation du couple CFP/YFP ne facilite pas la modélisation des résultats d'hétéroFRET. Néanmoins, une analyse quantitative comparant les deux études, anisotropie et hétéroFRET, a pu être menée. Dans le cadre du modèle de dimère, considérons la durée de vie moyenne de la CFP, $\langle \tau_{CFP} \rangle = 2,5$ ns, et la vitesse de transfert de l'homoFRET GFP/GFP, $k_T = 0,208$ ns⁻¹. L'équation II. 3. 26 peut s'écrire sous la forme

$$= \tau_{GFP}^{-1} (R_{0,GFP} / R)^6 \quad (V. 2. 3)$$

et l'équation II. 2. 7 peut s'écrire aussi sous la forme

$$k_T = \langle \tau_{CFP} \rangle^{-1} (R_{0_CFP/YFP} / R)^6 \quad (V. 2. 4)$$

avec k_T la vitesse de transfert dans l'expérience d'hétéroFRET. En combinant ces deux équations par substitution de R , on obtient

$$k_T = \tau_{GFP} / \langle \tau_{CFP} \rangle (R_{0_CFP/YFP} / R_{0_GFP})^6 \quad (V. 2. 5)$$

L'équation II. 2. 1 donnant la durée de vie du donneur en présence d'accepteur, ici $\langle \tau_{CFP/YFP} \rangle$, peut s'écrire aussi sous la forme

$$\langle \tau_{CFP/YFP} \rangle = (k_T + \langle \tau_{CFP} \rangle^{-1})^{-1} \quad (V. 2. 6)$$

De plus, dans les expériences d'hétéroFRET détectant une interaction homologue, comme il l'a été discuté, la durée de vie expérimentale moyenne, $\langle \tau_{exp} \rangle$, correspond à deux situations que l'on supposera équiprobables, l'une où il y a du transfert, l'autre non, et on a alors

$$\langle \tau_{exp} \rangle = (\langle \tau_{CFP/YFP} \rangle + \langle \tau_{CFP} \rangle) / 2 \quad (V. 2. 7)$$

En appliquant les équations V. 2. 5, V. 2. 6 et V. 2. 7 aux données numériques avec $\tau_{GFP} = 2,6$ ns, $R_{0_CFP/YFP} = 52$ Å et $R_{0_GFP} = 47$ Å (voir Ch. IV. 2. 1), on obtient alors $\langle \tau_{exp} \rangle = 1,88$ ns. Cette valeur est légèrement différente des valeurs expérimentales mesurées : $2,18 \pm 0,09$ ns ($n = 3$). Cette différence s'explique par les approximations effectuées dans ce traitement théorique : (i) une des deux espèces de CFP (deux durées de vie) pourrait transférer plus efficacement son énergie à la YFP et les équations V. 2. 5 et V. 2. 6 ne seraient plus valables, et (ii) le nombre de dimères CFP/CFP et CFP/YFP ne serait pas le même et l'équation V. 2. 7 ne serait plus valable.

Une comparaison de l'approche d'anisotropie avec des expériences de FRET mettant en jeu un couple GFP/DsRed permettrait certainement de mieux appréhender les différences. Néanmoins, il apparaît déjà que l'approche des interactions homologues de protéines par anisotropie s'avère un outil plus informatif pour caractériser l'état d'oligomérisation d'une protéine et la structure du complexe associé.

V. 2. 3. 2. Interprétation biologique : relation structure – activité en cellules vivantes

S'agissant de la cinétique d'apparition des dimères de TK₃₆₆GFP, les mesures de FRET et d'anisotropie montrent qu'il existe une certaine corrélation entre ces dimères et l'apparition d'agrégats. De même, une imagerie quantitative de l'expression des protéines TK₃₆₆GFP et GFP en cellules a permis de constater que l'agrégation de ces protéines est spécifique de la partie TK de la protéine et qu'elle est indépendante du niveau d'expression protéique (Tramier et al., 2001). Les résultats d'anisotropie obtenus dans les agrégats présentent bien une anisotropie résiduelle aux temps longs caractéristique d'une organisation anisotrope des dipôles de transition et donc incompatible avec une agrégation désordonnée. Prenant en compte ces différents résultats, un modèle cinétique de la formation des dimères et des agrégats peut être proposé (Fig. V. 12). Initialement, les protéines fusion sont sous forme de monomère, comme il a été détecté par anisotropie dans les cellules juste un jour après transfection. Puis la formation de dimères est antérieure à la formation d'agrégats, les résultats de FRET et anisotropie détectant aussi du transfert provenant de la fluorescence diffuse de cellules contenant des agrégats. Les agrégats seraient alors constitués de dimères qui n'interagiraient pas les uns avec les autres, impliquant très probablement d'autres protéines cellulaires.

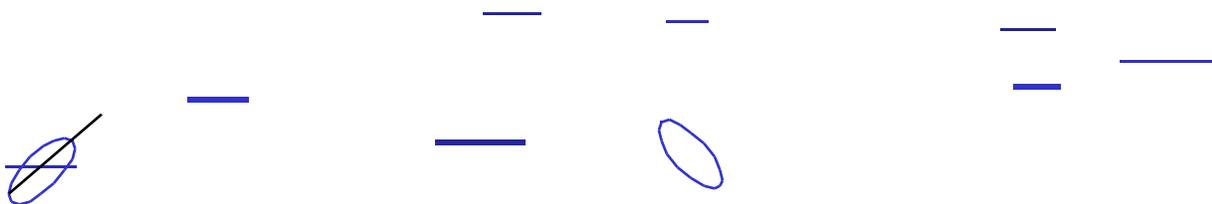


Figure V. 12 : Modèle cinétique de la formation des dimères et des agrégats de TK₃₆₆GFP.

Certaines questions d'ordre physiologique se posent alors concernant la formation tardive des dimères et la formation de ces agrégats. Sachant que la TK est cristallisée sous forme de dimère

(Wild et al., 1997) et qu'elle est active sous cette forme en solution (Fetzer et al., 1994, Waldman et al., 1983), une étude de l'activité enzymatique par incorporation de thymidine tritiée dans les cellules transfectées avec la protéine TK₃₆₆GFP menée par Isabelle Gautier montre que l'activité détectée ne dépasse pas 10 % de l'activité TK seule. La protéine formée des 366 premiers acides aminés de la TK présente également une activité très faible de l'ordre de 10 % de l'activité contrôle. Dans ces constructions, l'hélice ₁₂ se trouve tronquée de ses 10 acides aminés C-terminaux (modèle de Wild, (Wild et al., 1997)). Cette partie de l'hélice ₁₂ est donc essentielle à la pleine activité enzymatique de la TK. La présence de la GFP ne semble pas être impliquée dans cette diminution d'activité. L'hélice ₁₂ est une des quatre hélices interagissant à l'interface monomère-monomère dans le cristal de TK (Wild et al., 1997). Il semble donc qu'il y ait un lien entre activité enzymatique de la TK et formation de dimères "natifs" et donc actifs provenant de l'interaction de protéines TK complètes.

Isabelle Gautier a aussi construit des protéines XFP_{239/226}TK, constituées des aa 1 à 239 de la séquence codant pour la CFP, la GFP et la YFP ou des aa 1 à 226 de la séquence codant pour la DsRed, puis des 2 à 376 aa de TK (l'XFP est ici en N-terminal de la TK). Exprimées en cellules, au contraire des protéines fusion avec la protéine autofluorescente en position C-terminale de la TK, les protéines fusion présentées ici ne forment pas d'agrégats. Elle a aussi testé l'activité enzymatique de ces protéines fusion qui présentent une activité 1,5 fois plus élevée que la protéine TK seule. L'étude de la dimérisation de ces protéines fusion par FRET ou anisotropie ouvre des perspectives particulièrement intéressantes en ce qui concerne le développement d'une approche combinée de la structure et de l'activité de protéines en cellules vivantes.

V. 3. Dynamique locale de macromolécules

L'éthidium s'intercale dans le noyau de cellules vivantes (Ch. IV. 2. 2. 3). Le travail présenté ici a consisté à caractériser la dynamique torsionnelle de l'ADN en cellule vivante en mesurant le déclin d'anisotropie de fluorescence de cet éthidium intercalé (Tramier et al., 2000). En effet, mesurer ce déclin, c'est mesurer la diffusion rotationnelle de l'éthidium. Lorsqu'il est intercalé, ses mouvements de diffusion rotationnelle sont caractéristiques des mouvements browniens de l'ADN. A l'échelle de temps mesurée, c'est la dynamique torsionnelle, c'est-à-dire les mouvements de torsion de l'ADN autour de son axe principal, qui sont pris en compte.

V. 3. 1. Dynamique torsionnelle de l'ADN

L'ADN chromatinisé dans le noyau de cellules de mammifère est hautement compacté, formé d'un motif de base, le nucléosome. Ce motif consiste en 1,75 tours vers la gauche d'ADN sous forme B (146 paires de bases de la double hélice droite) qui constitue une super-hélice elle-même organisée autour d'un octamère de protéines, les histones. Des études structurales par rayon X montrent que, à la surface de l'octamère, des résidus amino-acides de charges positives sont distribués de telle sorte que ces charges s'ajustent parfaitement avec les résidus phosphates chargés négativement de l'ADN (Arents & Moudrianakis, 1993). La figure V. 13 présente la structure du nucléosome.

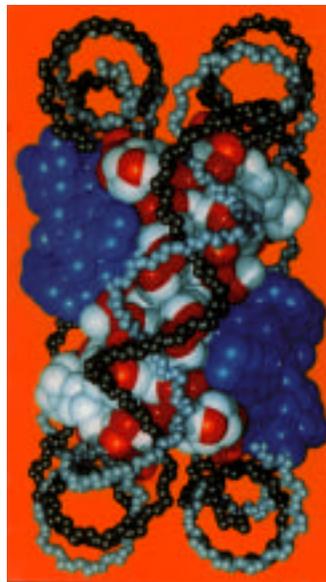


Figure V. 13 : Structure cristallographique du nucléosome (d'après Arents et Moudrianakis, 1993).

Ces interactions ADN-octamère d'histones ont été confirmées avec la structure cristallographique du nucléosome entier (Luger et al., 1997). Deux nucléosomes sont séparés par une séquence de liaison d'ADN. Cette séquence de liaison est typiquement associée soit avec les histones H1 (ou H5) ce qui induit une compaction supplémentaire de l'ADN (Leuba et al., 1998), soit avec des complexes multiprotéiques impliqués dans la transcription (Ashraf & Ip, 1998; Carey, 1998) ou dans la réplication (Baker & Bell, 1998).

Différentes expériences ont essayé de caractériser la structure de la chromatine à l'intérieur même de la cellule : la taille des séquences de liaison entre les nucléosomes (van Holde, 1989), leur degré de sur-enroulement (Jupe et al., 1993), l'organisation d'ordre supérieur (Rydberg et al., 1998), la réorientation rotationnelle (Selvin et al., 1990), et la dynamique (Lamond & Earnshaw, 1998, Manders et al., 1999) de la chromatine. Dans la plupart de ces expériences, les cellules sont soit fixées, soit perméabilisées, ou les mesures sont effectuées sur la chromatine extraite. Les interactions ADN-protéine, impliquées dans la structure native de la chromatine, peuvent être facilement perturbées durant les manipulations cellulaires ou l'observation, comme cela a été caractérisé en observant une sonde fluorescente (l'acridine orange) en cellules vivantes (Delic et al., 1991). Ainsi, l'organisation *in vivo* de la chromatine peut être considérée comme encore largement inconnue, en particulier à cause des techniques invasives appliquées jusqu'ici.

In vivo, la cellule réplique son ADN nucléaire entièrement et ce en quelques heures seulement. On peut supposer que, dans la cellule, l'ADN nucléaire (formant principalement des nucléosomes lorsqu'il est extrait) interagirait dynamiquement avec les protéines de la chromatine de telle manière que cette dynamique servirait à utiliser les propriétés intrinsèques de la double hélice, comme l'élasticité et la flexibilité, à la progression des polymérase. Notre objectif consiste donc à examiner la dynamique dont l'ADN est doté en cellule vivante. La rigidité torsionnelle de l'ADN est un facteur énergétique important impliqué dans la formation de structures nucléoprotéiques (Echols, 1986). L'interaction de certaines protéines, comme HMG I (High Mobility Group I), requiert une courbure et une torsion nulle de l'ADN, modifiant son petit sillon et s'ajustant au contour de la protéine (Grosschedl, 1995). Des études de déclin d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium

interagissant avec l'ADN ont été menées pour examiner la dynamique interne de l'ADN (Wahl et al., 1970). La dépolarisation expérimentale de cette fluorescence a été théoriquement analysée dans le cadre des mouvements de torsion de l'ADN le long de l'axe de la double hélice (voir Ch. II. 3. 5). Cette modélisation est particulièrement adaptée à l'étude de la dynamique torsionnelle de l'ADN (Allison & Schurr, 1979, Schurr, 1984) et sa restriction par des déformations structurales comme la courbure (Heath et al., 1996) ou l'immobilisation de sa double chaîne dans le nucléosome (Winzeler & Small, 1991).

V. 3. 2. Résultats

La modélisation de la dynamique torsionnelle de l'ADN à partir de l'anisotropie de fluorescence de l'éthidium intercalé est présentée chapitre II. 3. 5. Ici, nous présentons les résultats des mesures de déclin d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium intercalé obtenus directement dans le noyau de cellules vivantes en utilisant le système confocal (Ch. IV. 1. 2).

V. 3. 2. 1. Déclins d'anisotropie de l'éthidium dans le noyau de cellules vivantes

Les déclins d'anisotropie, $r(t)$, de la fluorescence de l'éthidium provenant d'un petit volume nucléaire de cellules vivantes sont présentés figure V. 14 pour trois concentrations d'éthidium appliquées (0,4, 4 et 10 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules ici sont des S2, lignée immortalisée provenant du rein de singe, les mêmes cellules que celles qui sont utilisées pour les études de durées de vie présentées chapitre IV. 2. 2. 3. Les déclins d'anisotropie ont été calculés et tracés après normalisation (voir Ch. IV. 1. 2. 1). Le temps d'acquisition pour ces déclins est de l'ordre de 45 à 60 minutes, temps durant lequel l'intensité reste stable. Dans certains cas, l'intensité de fluorescence augmente, caractéristique d'une cellule rentrant en apoptose et ces données n'ont pas été prises en compte. Les courbes présentées sont bruitées aux temps longs (70 ns). Malgré la longueur du temps d'acquisition, le très faible niveau de fluorescence de l'éthidium dans le noyau (voir Ch. IV. 2. 2. 3) rend difficile une meilleure statistique.

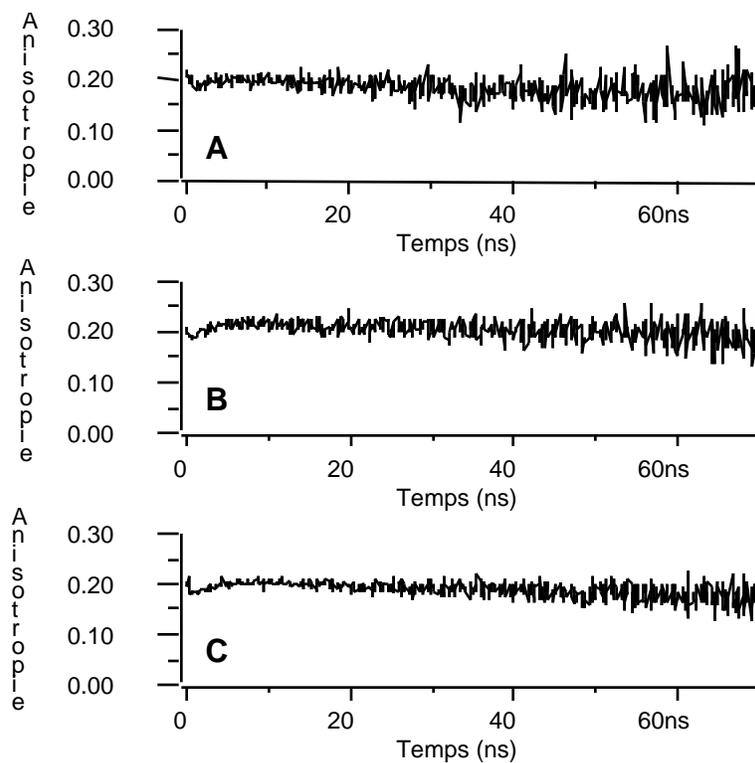


Figure V. 14 : Déclins d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium nucléaire en cellules S2 vivantes. Différentes concentrations d'incubation du bromure d'éthidium ont été utilisées : (A) 1 µg/ml, (B) 4 µg/ml, (C) 10 µg/ml. Les expériences ont été menées avec le système confocal et en présence d'éthidium dans le tampon à $\lambda_{exc} = 498$ nm et $\lambda_{em} > 515$ nm. Les déclins de fluorescence utilisés pour le calcul de la fonction d'anisotropie ont été normalisés par la méthode de normalisation expérimentale présentée chapitre IV. 1. 2. 1.

Néanmoins, deux caractéristiques se dégagent de ces courbes : (i) la relaxation d'anisotropie est très lente, et (ii) les courbes présentent une diminution puis une remontée aux temps courts (dip-and-rise). Un tel "dip-and-rise" avait déjà été présenté pour de l'ADN ou de l'ARN de transfert en solution avec de l'éthidium (Brochon, 1994, Guest et al., 1991, Hazlett et al., 1989). Il correspond à l'anisotropie de deux espèces indépendantes caractérisées par deux durées de vie et deux temps de relaxation différents. De fait, l'anisotropie de ces deux espèces ne correspond pas à la somme des anisotropies (Ch. II. 3. 2, Eq. II. 3. 15). On parle alors de modèle non-associatif (Knutson et al., 1986). Ce "dip-and-rise" de relaxation d'anisotropie peut être simulé en utilisant un modèle où coexistent deux espèces distinctes d'éthidium (50 % de chaque), l'une caractérisée par une durée de vie courte (1,8 ns) et un temps de relaxation court (250 ps), l'autre par une durée de vie longue (22

ns) et un long temps de relaxation (250 ns), correspondant respectivement à l'éthidium libre et intercalé. La simulation effectuée avec le logiciel Global Analysis (Urbana, Illinois) (Fig. V. 15) correspond assez fidèlement aux courbes expérimentales. Ainsi, le "dip-and-rise" de l'anisotropie de fluorescence de l'éthidium indiquerait la présence d'éthidium libre en proportion non négligeable, quelle que soit la concentration d'incubation, et confirme encore ce qui avait déjà été présenté chapitre IV. 2. 2. 3 que l'intercalation de l'éthidium dans l'ADN nucléaire de cellules proliférantes est fortement inhibée.

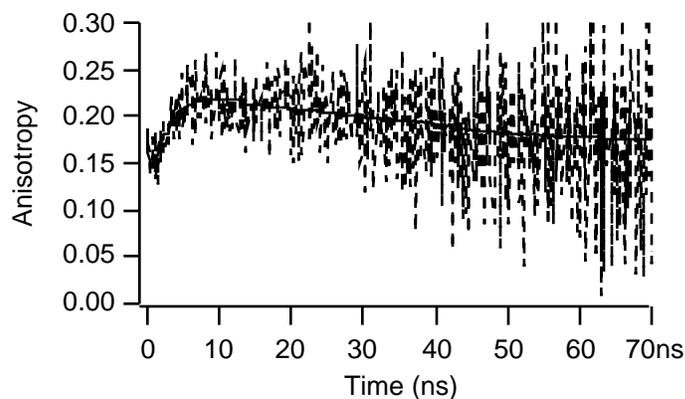


Figure V. 15 : Simulation de "dip-and-rise" de déclin d'anisotropie.

La simulation est basée sur un modèle de deux espèces distinctes ayant la même concentration, une avec une durée de vie courte (1,8 ns) et un temps de relaxation d'anisotropie court (250 ps), l'autre avec une durée de vie plus longue (22 ns) et un long temps de relaxation d'anisotropie (250 ns).

V. 3. 2. 2. Dynamique torsionnelle restreinte de l'ADN nucléaire en cellules vivantes

Les déclin d'anisotropie présentés figure V. 14 ont été obtenus avec de l'éthidium présent dans le milieu extracellulaire. Pour éliminer la contribution de l'éthidium libre et pour mesurer uniquement l'anisotropie de l'éthidium intercalé, les cellules ont été rincées. Après le rinçage, les mesures de durées de vie confirment que l'éthidium libre est alors absent du noyau et que la quantité d'éthidium intercalé décroît très lentement pendant l'acquisition de l'anisotropie : moins de 5 % des molécules intercalées ont été dissociées à la fin des mesures. La figure V. 16. A montre le déclin d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium nucléaire après rinçage : le "dip-and-rise" est alors absent et la très lente relaxation d'anisotropie, comme cela avait été observé figure V. 14,

demeure. Ceci démontre que le "dip-and-rise" était bien dû à la présence d'éthidium libre dans le noyau.

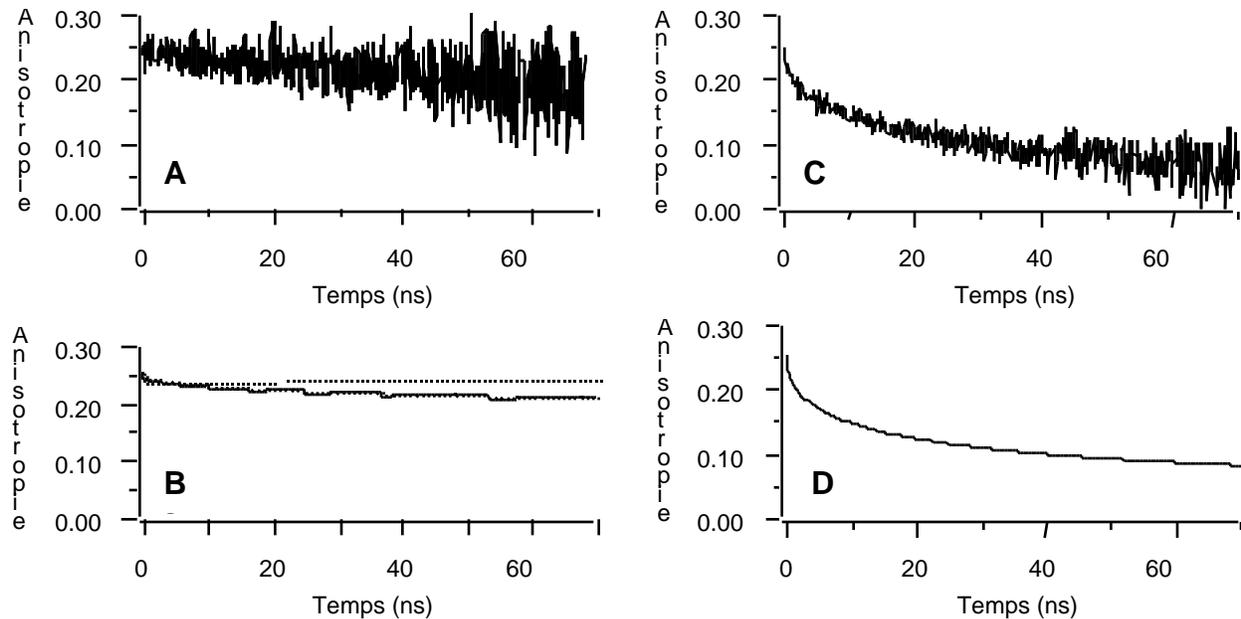


Figure V. 16 : Déclins d'anisotropie et simulations de la fluorescence de l'éthidium intercalé dans le noyau de cellules S2 vivantes et dans l'ADN de phage .
 (A) Noyau d'une cellule S2 vivante incubée par 4 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium puis rincé. (B) Simulation de relaxation d'anisotropie utilisant le modèle développé par Schurr (Schurr, 1984 ; Schurr et Schurr, 1985) (voir Ch. II. 3. 5) avec deux jeux de paramètres : (pointillé) $N = 20$, $\tau = 6,5 \cdot 10^{-12}$ dyne.cm et $\tau' = 6 \cdot 10^{-23}$ dyne.cm.s ; (continu) $N = 100$, $\tau = 6,5 \cdot 10^{-12}$ dyne.cm et $\tau' = 6 \cdot 10^{-22}$ dyne.cm.s. (C) Solution d'ADN de phage à 50 $\mu\text{g/ml}$ en présence de 4 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium. (D) Simulation de relaxation d'anisotropie utilisant le modèle développé par Schurr et collaborateurs (Thomas et coll., 1980) (voir Ch. II. 3. 5) avec $\tau = 6,5 \cdot 10^{-12}$ dyne.cm et $\tau' = 6 \cdot 10^{-23}$ dyne.cm.s. Les déclins d'anisotropie (A et C) ont été mesurés en utilisant le système confocal à $\lambda_{\text{exc}} = 498$ nm et $\lambda_{\text{em}} > 515$ nm. Les déclins de fluorescence utilisés pour le calcul de la fonction d'anisotropie ont été normalisés par la méthode de normalisation expérimentale présentée chapitre IV. 1. 2. 1. Les simulations ont été effectuées en utilisant le logiciel Igor Pro et en prenant $r_0 = 0,25$.

Pour estimer le degré de restriction torsionnelle de l'ADN nucléaire, nous avons comparé cette anisotropie avec celle d'un système modèle, l'ADN nu en solution en évitant toute contribution liée au transfert d'énergie (un éthidium pour 150 paires de bases) (Tichadou et al., 1975). L'anisotropie de l'éthidium intercalé dans l'ADN de phage (Fig. V. 16. C), est bien celle caractéristique de la relaxation d'anisotropie de l'éthidium intercalé dans l'ADN nu. La forme de ce déclin est similaire à ce qui est obtenu par simulation de la dynamique torsionnelle en utilisant le modèle présenté chapitre II. 3. 5 pour un ADN considéré infini. Pour toutes les simulations, la

valeur du r_0 , l'anisotropie initiale, a été choisie à 0,25 correspondant au r_0 pour une ouverture numérique de 1,3, ouverture numérique utilisée dans ces expériences. Pour cette simulation (Fig. V. 16. D), le coefficient de torsion et le coefficient de friction qui ont été choisis valent : $\tau = 6,5 \cdot 10^{-12}$ dyne.cm ; $\gamma = 6 \cdot 10^{-23}$ dyne.cm.s. Ces valeurs des paramètres de dynamique torsionnelle correspondent à celles qui sont données dans la littérature pour l'ADN nu (Heath et al., 1996, Thomas et al., 1980).

En comparaison, l'anisotropie de fluorescence de l'éthidium, intercalé dans le noyau de cellules vivantes, relaxe bien plus lentement (Fig. V. 16. A). Des simulations de déclin d'anisotropie ont été menées en utilisant le modèle modifié par Schurr et collaborateurs où l'éthidium est intercalé dans des domaines finis de paires de bases rigidement fixés aux extrémités (Schurr, 1984, Schurr & Schurr, 1985) (voir Ch. II. 3. 5). Trois paramètres, τ , γ et N, caractérisent maintenant ce modèle, avec N représentant le nombre de paires de bases impliquées dans le mouvement de torsion, c'est-à-dire le nombre de paires de bases entre les deux extrémités fixées. Nous supposons que τ , le coefficient de torsion, est identique à celui de l'ADN nu, correspondant à la valeur de l'ADN sous forme B. Les simulations montrent que la dynamique torsionnelle des sites d'intercalation de l'éthidium dans l'ADN nucléaire est restreinte, soit parce que N est petit (avec τ faible), soit parce que γ est grand (avec N grand) (Fig. V. 16. B). Ces deux possibilités correspondent à des sites d'intercalation différents. Dans le premier cas, ces sites sont de petites régions d'ADN nu bordées par des interactions suffisamment fortes pour empêcher la propagation de la dynamique torsionnelle sur des domaines plus grands. Dans le second cas, ces sites sont plus grands mais la viscosité du milieu proche des paires de bases est plus importante. L'augmentation de cette viscosité peut être causée par des interactions protéiques relativement faibles tout le long du domaine. Un modèle est présenté figure V. 17. Des cinétiques plus précises seraient nécessaires pour discriminer entre ces deux hypothèses dont la signification biologique est différente. On ne peut pas exclure également l'existence conjointe de ces deux sortes de sites d'intercalation dans la chromatine.

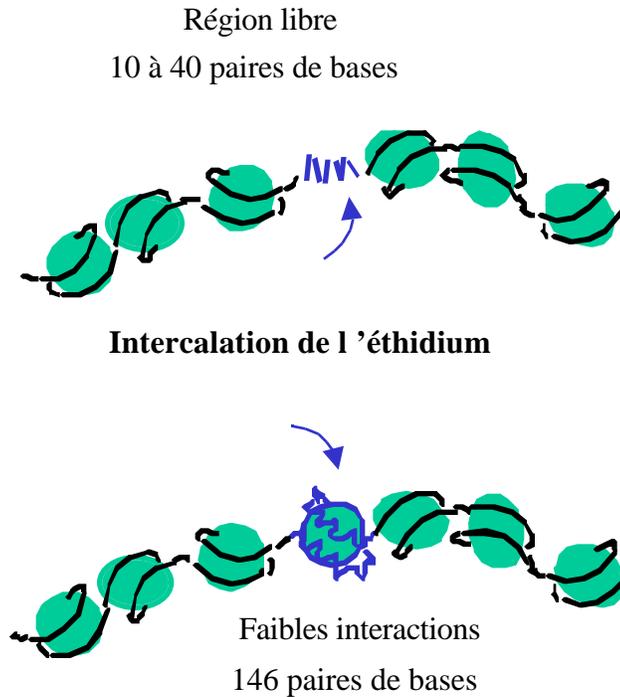


Figure V. 17 : Modèles des sites d'intercalation de l'éthidium dans la chromatine de cellules proliférantes vivantes.
(haut) Séquence de liaison entre les nucléosomes ; (bas) ADN nucléosomé. Ces deux modèles représentant les sites d'intercalation potentiels de l'éthidium sont en accord avec les simulations présentées figure V. 16 B et correspondent bien à une dynamique torsionnelle restreinte de l'ADN.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas la preuve que, dans le noyau, l'éthidium est exclusivement intercalé dans l'ADN et pas dans les régions double chaîne des ARNs. Néanmoins, si une partie de la fluorescence mesurée provenait de l'intercalation de l'éthidium dans l'ARN, l'inhibition d'intercalation de l'éthidium dans l'ADN serait encore plus forte et, consécutivement, la dynamique torsionnelle de l'ADN encore plus restreinte (voir Ch. V. 3. 3. 1). Cette dynamique restreinte semble être une propriété générale des cellules en culture puisque des cellules complètement différentes, des neurones de rat en culture primaire, présentent cette même propriété lorsque l'on utilise de faibles concentrations d'éthidium.

V. 3. 2. 3. Effet de l'augmentation de la concentration d'éthidium sur la dynamique torsionnelle de l'ADN nucléaire

A 10 $\mu\text{g/ml}$ comme concentration d'incubation, les propriétés mesurées dans les cellules S2, proliférantes, ne varient pas. Par contre, alors qu'à plus faible concentration dans les neurones de rat en culture primaire, l'inhibition de l'intercalation et la restriction de la dynamique torsionnelle ont pu être démontrées, en augmentant la concentration d'incubation de l'éthidium à 10 $\mu\text{g/ml}$, on observe un comportement très différent de celui des cellules proliférantes. La figure V. 18 présente une comparaison dans les neurones et les S2 à 10 $\mu\text{g/ml}$.

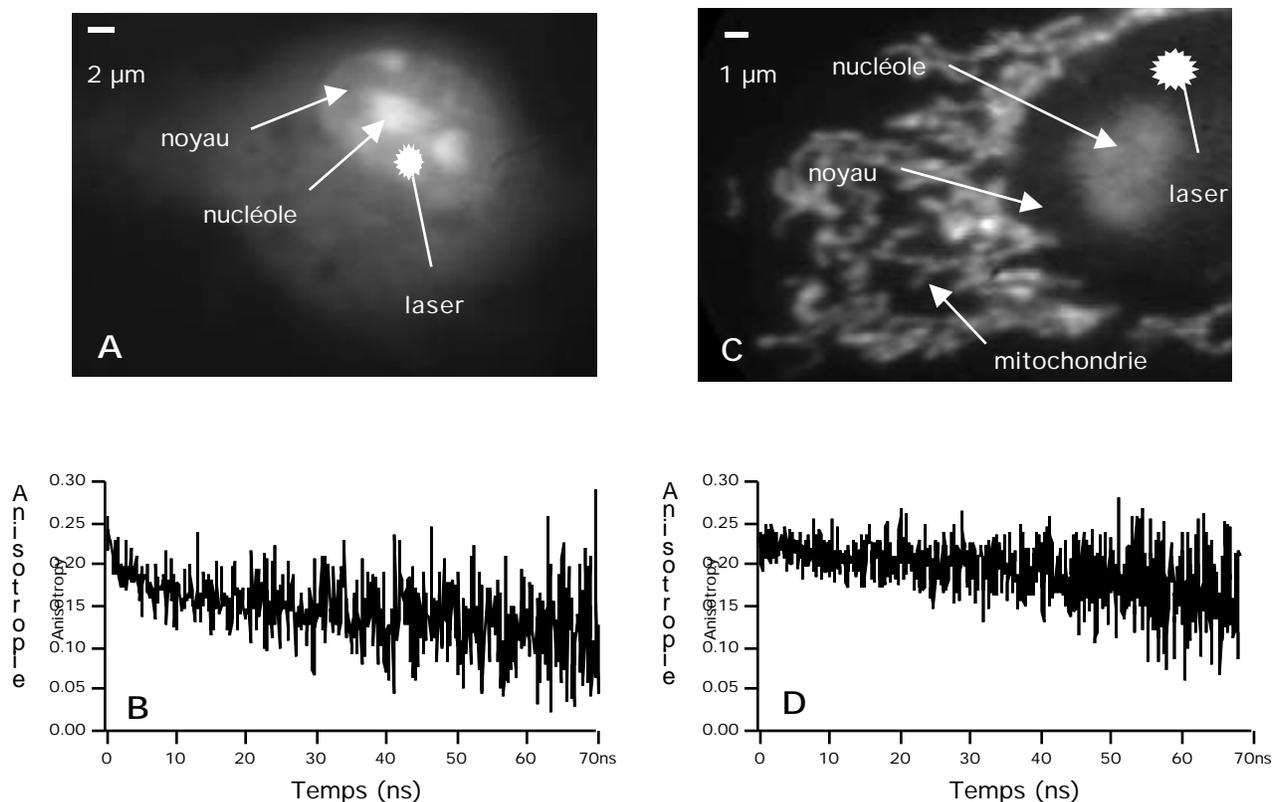


Figure V. 18 : Comparaison des déclin d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium dans le noyau de neurones de rat en culture primaire et de cellules S2.

(A et C) Images de fluorescence stationnaire ; (B et D) Déclin d'anisotropie de la fluorescence, dont la localisation subcellulaire est indiquée sur les images A et C, mesurés avec le système confocal à $\lambda_{exc} = 498 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} > 515 \text{ nm}$. (A et B) Neurone de rat en culture primaire ; (C et D) Cellules proliférantes S2. Les cellules ont été incubées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium pendant 30 minutes à 37°C puis rincées. Les déclin de fluorescence utilisés pour le calcul de la fonction d'anisotropie ont été normalisés par la méthode de normalisation expérimentale présentée chapitre IV. 1. 2. 1.

Déjà en intensité stationnaire, la figure V. 18. A présente une intensité de fluorescence significative pour la chromatine, alors qu'en S2, l'inhibition d'intercalation est toujours présente (Fig. V. 18. C). Ces résultats sont confirmés par des études de durée de vie et de concentration. À 0,4 µg/ml, le rapport libre sur intercalé est de 1,81 pour les S2 alors qu'il est de 0,66 pour les neurones. Cette variation s'accroît encore en augmentant la concentration.

Les mesures de déclin d'anisotropie de l'éthidium intercalé, après rinçage, permettent de mettre en évidence une diminution de la restriction de la dynamique torsionnelle de l'ADN au niveau des sites d'intercalation (Fig. V. 18. B et D). En effet, qualitativement, on observe une relaxation plus rapide pour l'anisotropie issue du noyau de neurones alors que pour les S2, la relaxation n'a pas varié par rapport à ce qui a déjà été présenté figure V. 16. A. La figure V. 19 présente deux simulations avec le coefficient de torsion, $\tau = 6,5 \cdot 10^{-12}$ dyne.cm et le coefficient de friction, $\gamma = 6 \cdot 10^{-23}$ dyne.cm.s, correspondant à l'ADN nu. Seul N varie (N = 20 ou N = 100). On observe que la relaxation plus importante pour N = 100 est localisée au début de la courbe, comme on peut le voir également sur les données expérimentales. C'est l'augmentation de N qui semble être impliquée dans la relaxation plus rapide.

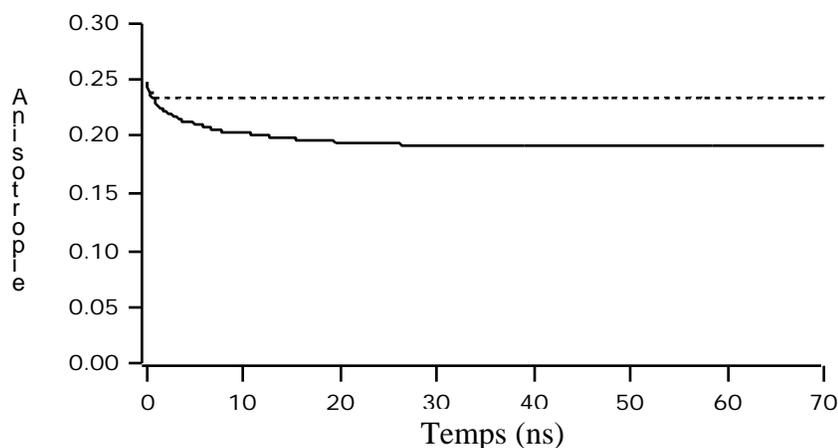


Figure V. 19 : Simulations par le modèle de Schurr avec N = 20 et N = 100.

Les simulations de relaxation d'anisotropie utilisent le modèle développé par Schurr (Schurr, 1984 ; Schurr et Schurr, 1985) (voir Ch. II. 3. 5) avec $\tau = 6,5 \cdot 10^{-12}$ dyne.cm et $\gamma = 6 \cdot 10^{-23}$ dyne.cm.s et en faisant varier N : N = 20 (pointillé) et N = 100 (continu). Les calculs ont été effectués en utilisant le logiciel Igor Pro et en prenant $r_0 = 0,25$.

Un modèle soutenant cette hypothèse est présenté figure V. 20. La diminution de la restriction de la dynamique est alors décrite par une dissociation de certaines protéines de la chromatine, ce qui élargirait les domaines d'intercalation en augmentant N, le nombre de paires de bases impliquées dans le mouvement (Fig. V. 20. A). Au contraire, dans les S2, il n'y a pas de dissociation des protéines (Fig. V. 20. B). Cette dissociation aurait pour origine l'intercalation de l'éthidium. En effet, en s'intercalant, l'éthidium ouvre légèrement la double hélice et l'allonge (Pulleyblank & Morgan, 1975, Wang, 1974) induisant des contraintes qui seraient à l'origine de la dissociation des interactions ADN-protéine, comme cela a été montré *in vitro* (McMurray & van Holde, 1991, Schröter et al., 1985, Winzeler & Small, 1991).

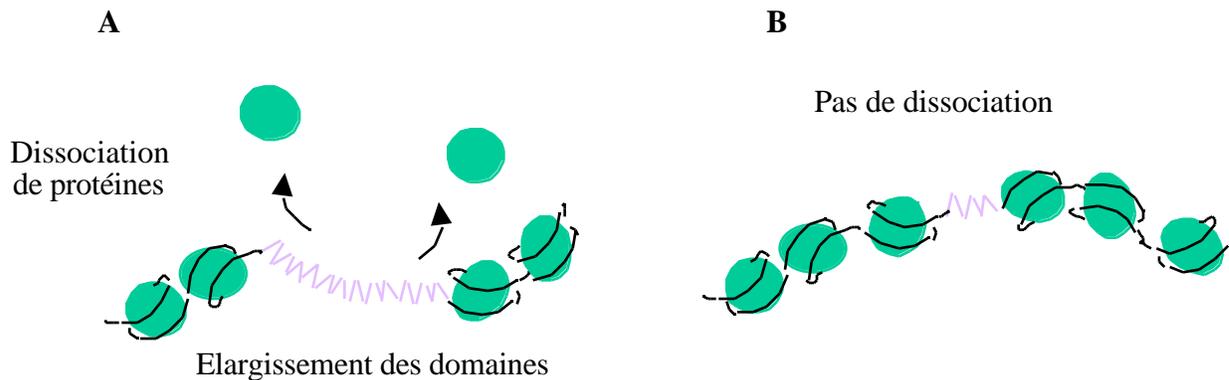


Figure V. 20 : Modèle de la moindre restriction de dynamique torsionnelle de l'ADN par dissociation des protéines.

(A) La dissociation des protéines élargit les domaines d'intercalation induisant une diminution de la restriction de relaxation d'anisotropie et augmentant la dynamique torsionnelle. (B) Les protéines ne sont pas dissociées et la dynamique torsionnelle est toujours restreinte.

V. 3. 3. Discussion

Il convient initialement de discuter les résultats de durée de vie caractérisant l'intercalation de l'éthidium dans le noyau qui sont présentés chapitre IV. 2. 2. 3. Le comptage de photons uniques, adapté ici à la microscopie confocale, permet la détection de molécules d'éthidium libre et intercalé dans le noyau de cellules vivantes après que les cellules ont été incubées avec cette sonde intercalante. Des concentrations comparables d'éthidium libre dans le noyau et dans le milieu extracellulaire ont été détectées, démontrant que le cation éthidium peut diffuser librement dans le

cytoplasme et le noyau. Ainsi, l'hypothèse considérant que l'absence, en cellule vivante, de fluorescence stationnaire dans le noyau était due à l'imperméabilité membranaire n'est plus valable. Le cation éthidium présente une forte fluorescence mitochondriale. Il est également présent dans le noyau, ce qui écarte la possibilité d'un piégeage mitochondrial qui empêcherait son intercalation dans l'ADN nucléaire. Ainsi, l'absence de fluorescence stationnaire significative dans le noyau de cellules vivantes, est bien due à la propension réduite de l'éthidium à s'intercaler dans la chromatine. Cette propriété est caractéristique de l'état vivant pour les cellules de mammifère proliférantes.

V. 3. 3. 1. L'anisotropie de l'éthidium comme outil non-invasif de l'étude de la dynamique locale de l'ADN en cellules vivantes

Bien que l'intercalation soit fortement inhibée, il a été possible d'obtenir des déclin d'anisotropie de fluorescence grâce à l'extrême sensibilité du comptage de photons uniques. La combinaison des durées de vie et de l'anisotropie révèle que l'inhibition de l'intercalation de l'éthidium est concomitante à une dynamique torsionnelle restreinte de l'ADN. Ce résultat concernant la dynamique restreinte s'appuie sur différentes observations.

Premièrement, la preuve de l'inhibition de l'intercalation de l'éthidium dans le noyau de cellules proliférantes vivantes provient du fait qu'une très faible quantité d'éthidium intercalé (identifié par sa durée de vie de 22 ns) est mesurée en présence d'éthidium libre dans le noyau (durée de vie de 1,8 ns), même à plus forte concentration. Ce déclin bi-exponentiel contraste avec le déclin mono-exponentiel issu de la solution d'ADN nu. Une confirmation indépendante de l'existence d'éthidium libre dans le noyau provient de l'existence d'un "dip-and-rise" dans l'anisotropie. Ce "dip-and-rise" est seulement observé lorsqu'il y a de l'éthidium libre dans le milieu extracellulaire, et ainsi dans le noyau. Le composé rapide du déclin d'anisotropie qui donne naissance au "dip-and-rise" correspond bien à l'éthidium libre diffusant librement dans le noyau.

Deuxièmement, on ne peut exclure la possibilité d'un homotransfert entre molécules d'éthidium intercalé, même à faible concentration, sachant que les sites d'intercalation peuvent se trouver concentrés dans de petits segments d'ADN. Comme il a été discuté dans la littérature (Wu

et al., 1991), la contribution de l'homoFRET pourrait produire un déclin d'anisotropie similaire à la relaxation par la dynamique torsionnelle lorsque l'on se trouve à faible rapport d'éthidium par paire de bases (jusqu'à 0,20 pour l'ADN nu). À plus fort rapport, une très rapide dépolarisation pourrait avoir lieu, dans une échelle de temps trop petite pour être résolue, et donc réduisant la valeur initiale de l'anisotropie, le r_0 . Ainsi, l'homoFRET pourrait potentiellement expliquer la faible valeur de r_0 obtenue pour l'anisotropie de l'éthidium intercalé dans le noyau en comparaison de ce qui a été obtenu pour la rhodamine 6G (Ch. IV. 1. 2. 3). Dans tous les cas, s'il existe un homotransfert dans les mesures d'anisotropie présentées ici, la rigidité torsionnelle de l'ADN serait alors sous estimée, renforçant nos conclusions.

Troisièmement, pour chaque molécule d'éthidium s'intercalant, l'hélice d'ADN s'ouvre d'un angle de 26° (Pulleyblank & Morgan, 1975, Wang, 1974). Le mécanisme d'intercalation de l'éthidium est contrôlé par des fluctuations structurales browniennes de l'ADN (Macgregor et al., 1987, Meyer-Almes & Porschke, 1993, Sobell et al., 1976). La constante d'association effective de l'éthidium et la dynamique interne de l'ADN sont corrélées (Clendenning et al., 1994, Härd & Kearns, 1990, Heath et al., 1996). Une décroissance de cette constante d'association parallèlement à une dynamique torsionnelle restreinte a lieu pour des petits plasmides circulaires (Heath et al., 1996), pour des complexes ADN-facteur de transcription (Härd & Kearns, 1990), et pour des nucléosomes isolés (Winzeler & Small, 1991). Dans le cas fort improbable où toutes les molécules d'éthidium intercalées le seraient dans l'ARN et non dans l'ADN, la dynamique interne de l'ADN serait encore plus restreinte. Ainsi, la forte inhibition d'intercalation et la très lente relaxation d'anisotropie contribuent toutes deux à démontrer que la dynamique torsionnelle de l'ADN nucléaire de cellules proliférantes vivantes est globalement restreinte.

Les expériences menées pourraient ne pas correspondre exactement à l'état natif non perturbé de la chromatine. À cela, il convient de confronter ce que nous avons observé en cellules S2 proliférantes : le rapport éthidium libre sur éthidium intercalé ne varie pas significativement lorsque l'on augmente la concentration d'éthidium et les déclins d'anisotropie sont superposables pour ces différentes concentrations appliquées. De plus, la dynamique interne de l'ADN linéaire n'est pas

affectée par l'intercalation de l'éthidium, même lorsqu'elle est importante (Clendenning et al., 1994, Smith et al., 1992, Wu et al., 1991). Les déclin d'anisotropie de fluorescence, acquis dans nos conditions, semblent bien correspondre à l'étude de l'état non perturbé de la chromatine.

L'inhibition de l'intercalation de l'éthidium disparaît après perméabilisation alors que la concentration d'éthidium libre dans le noyau ne change pas. La perméabilisation détruit probablement certaines interactions nucléoprotéiques comme cela a été proposé précédemment (Delic et al., 1992, Delic et al., 1991). Les études menées sur chromatine extraite ou sur cellules perméabilisées, doivent être interprétées avec attention. Elles ne peuvent produire des preuves directes concernant l'état structural de la chromatine native à l'intérieur même de la cellule vivante. Pour cette raison, les études par déclin d'anisotropie paraissent un outil très utile pour sonder la dynamique interne de l'ADN, et ce, directement en cellules vivantes.

V. 3. 3. 2. Interactions ADN–protéine qui restreignent la dynamique torsionnelle de l'ADN nucléaire en cellules vivantes

Les régions de l'ADN nucléaire où l'éthidium s'intercale correspondent à des segments de forte restriction de la dynamique torsionnelle. Cette restriction peut provenir de différents mécanismes non exclusifs comme une altération de structure secondaire par contrainte de courbure (Clendenning et al., 1994, Heath et al., 1996), des interactions protéiques spécifiques, par exemple les histones dans la compaction nucléosomale (Winzeler & Small, 1991), et/ou l'introduction de régions courbées (Härd & Kearns, 1990).

À la lumière des modélisations présentées dans ce travail, les sites d'intercalation peuvent correspondre à deux structures : (i) des petites régions d'ADN nu, et/ou (ii) des complexes nucléoprotéiques de plus grandes tailles. Il a été montré *in vitro* que les intercalants interagissaient principalement avec les séquences de liaison entre les nucléosomes de la chromatine (Angerer & Moudrianakis, 1972, McMurray & van Holde, 1991, Sogo et al., 1984, Yao et al., 1993) ou encore dans les régions d'ADN formant des coudes à la surface de l'octamère (Hogan et al., 1987). Aussi,

les sites d'intercalation sont-ils probablement soit les séquences de liaison, soit le nucléosome lui-même, soit les deux.

La question qui reste encore largement ouverte est la fonction biologique de ces sites où l'éthidium s'intercale, s'il y en a une. L'empaquetage de l'ADN sous forme de chromatine inhibe la progression des polymérase *in vitro* (Owen-Hughes & Workman, 1994, Widom, 1998), pourtant, les cellules répliquent et transcrivent leur ADN *in vivo*. Dans des modèles récents, dérivé d'études *in vitro* de polymérisation sur des nucléosomes, l'existence de régions d'ADN nu de toute interaction protéique, qui pourraient être de l'ordre de quelques dizaines de paires de bases, a été supposée apparaître de manière transitoire et provenir de la dissociation partielle de l'octamère d'histones de l'ADN dans le nucléosome (Studitsky et al., 1997). Une des pistes serait donc que les sites d'intercalation correspondent aux régions nues d'ADN directement impliquées dans la transcription ou la réplication.

L'intercalation de l'éthidium peut provoquer la dissociation de protéines de l'ADN nucléaire. En effet, l'augmentation de la concentration d'éthidium dissocierait certaines protéines de la chromatine (Schröter et al., 1985). La dissociation des histones de l'ADN pour des nucléosomes isolés par intercalation de l'éthidium serait coopérative (McMurray & van Holde, 1991, Winzeler & Small, 1991). Dans nos expériences, si à très faible concentration d'éthidium, la dynamique torsionnelle mesurée est identique dans les deux types cellulaires examinés, les neurones et les S2, en augmentant la concentration d'éthidium, cette dynamique devient moins restreinte uniquement pour les neurones. Un travail portant sur l'étude de la dynamique torsionnelle de l'ADN dans des nucléosomes isolés *in vitro* utilise la même technique de déclin d'anisotropie de l'éthidium intercalé (Winzeler & Small, 1991). Il révèle une forte restriction de la dynamique torsionnelle de l'ADN dans le nucléosome à faible rapport d'éthidium par paires de bases (comparable à ce qui est mesuré à faible concentration en cellule, soit $\sim 0,0001$ éthidium/paire de bases). En augmentant ce rapport, cette contrainte est coopérativement diminuée et correspond à la dissociation du nucléosome. On peut donc supposer que c'est ce qu'il se passe dans le noyau de neurone, au contraire des cellules

S2 proliférantes. L'augmentation de concentration d'éthidium, augmentant parallèlement le rapport éthidium par paire de bases, induirait la dissociation de certaines interactions protéiques.

La comparaison des diverses situations peut donc se discuter dans l'hypothèse de la dissociation ADN-protéine générant une dynamique interne plus importante. Dans ce cas alors, le comportement dissemblable observé en cellules proliférantes et en neurones, s'expliquerait par des forces d'interactions ADN-protéines plus ou moins fortes dans ces deux types de cellules. En tous cas, l'éthidium serait capable de déplacer des interactions en neurones plus facilement qu'en cellules proliférantes. En allant plus loin, si les sites d'intercalation de l'éthidium étaient impliqués dans la réplication, comme les interactions protéiques qui délimitent et génèrent ces sites semblent plus faibles dans les neurones que dans les cellules proliférantes, alors on peut prudemment avancer que le mécanisme de réplication pourrait prendre place dans des structures où les interactions ADN-protéine sont très fortes.

V. 3. 3. 3. Perspectives

Pour confirmer les différences observées en neurone de rat et en S2 (cellules de rein de singe transformées et proliférantes), une étude plus précise des propriétés de dynamique torsionnelle pourrait être menée. La détermination des paramètres du modèle (, et N) qui ajusterait les déclin d'anisotropie est requise pour une meilleure compréhension de l'origine de ces contraintes. Est-ce due à de petits domaines non restreints ou à de plus grands domaines faiblement restreints par interaction protéique ? De mêmes études en imagerie, avec le détecteur quadrant-anode par exemple, permettraient de comparer simultanément différentes régions d'un même noyau.

Pour mieux déterminer les caractéristiques biologiques qui seraient à l'origine du comportement différent des cellules neuronales et S2 vis-à-vis de la stabilité des interactions protéine-ADN qui restreignent la dynamique torsionnelle de l'ADN, il faudrait refaire ces études sur d'autres modèles cellulaires. Par exemple, certaines lignées cellulaires peuvent soit proliférer, soit se différencier en cellules neuronales (ND7) ou en myotubes (C2). Ainsi, on pourrait

rechercher si l'induction de la différenciation serait liée aux propriétés nucléaires mises en évidence ici.

Une caractérisation plus précise des interactions protéiques proches des domaines d'interaction pourrait être menée par FRET entre la protéine d'intérêt fusionnée à la GFP et l'éthidium intercalé. Le couple GFP/éthidium est compatible avec ces études. Un travail a été initié dans ce sens au laboratoire avec certaines histones.

Concernant la transcription, certaines protéines des complexes régulateurs, dont on a démontré l'implication dans les cancers, modulent la transcription via des modifications épigénétiques de la chromatine (Jacobson & Pillus, 1999, Jones & Laird, 1999). Ces modifications épigénétiques (telles que l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN) se répercuteraient sur la stabilité du nucléosome (Bird & Wolffe, 1999, Tyler & Kadonaga, 1999). En effet, la chromatine constitue un environnement dynamique de l'expression génétique. La régulation de cette expression semble être associée à un remodelage de la chromatine. L'acétylation des histones affaiblit les interactions entre chaînes N-terminales des histones fortement chargées et la double hélice d'ADN (Arents & Moudrianakis, 1993, Luger et al., 1997). À l'opposé, la désacétylation des histones conduit au rapprochement des nucléosomes. L'état d'acétylation des histones est contrôlé par des acétyl-transférases et des désacétylases, activités portées par la plupart des co-activateurs/co-répresseurs des facteurs de transcription. La méthylation de l'ADN interfère aussi avec la transcription, soit en inhibant la fixation des facteurs de transcription à l'ADN, soit indirectement via le recrutement d'une histone désacétylase. Ainsi, il paraît intéressant d'étudier, directement en cellules vivantes, la stabilité du nucléosome en fonction de l'état d'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN. Ces études pourraient être réalisées par déclin d'anisotropie de l'éthidium intercalé pour caractériser la dynamique torsionnelle et sa variation en fonction de la concentration d'éthidium appliquée mais aussi par FRET, si l'interaction histone-ADN peut être caractérisée par FRET entre GFP et éthidium.

Chapitre VI : Conclusion et potentialités de la technique

Dans ce travail, nous avons démontré comment le comptage de photon unique corrélé en temps (TCSPC) peut être utilisé en microscopie de fluorescence en cellules vivantes pour mettre en évidence (i) des interactions protéine-protéine hétérologues ou encore homologues au sein d'un oligomère, et (ii) la dynamique rotationnelle globale de protéines ainsi que la dynamique locale de polymères comme l'ADN. Cette technique mesurant les déclins de fluorescence a des avantages considérables : (i) elle est extrêmement sensible, ce qui permet de minimiser les perturbations induites lors de l'observation en cellules vivantes et de pouvoir détecter des niveaux de fluorescence très faibles sans avoir besoin de sur-exprimer les protéines fusionnées à des protéines fluorescentes, (ii) elle permet la mesure de FRET par la durée de vie de fluorescence du donneur, mesure insensible aux variations de concentration des fluorophores, (iii) elle permet l'acquisition de déclins d'anisotropie de fluorescence, approche utilisée pour caractériser la dynamique macromoléculaire à l'échelle moléculaire et/ou pour révéler de l'homoFRET lorsqu'une protéine s'homodimérise.

Les techniques de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) par phase et modulation à une fréquence unique de modulation (Bastiaens & Squire, 1999, Lakowicz et al., 1992, So et al., 1995, Verkman et al., 1991) ont jusqu'à présent l'inconvénient majeur de ne pas décrire complètement la cinétique de fluorescence et de caractériser une durée de vie moyenne. Des développements récents tentent d'améliorer cette technique en permettant une acquisition multi-fréquentielle (Squire et al., 2000). Néanmoins, un avantage majeur de cette approche utilisant une seule fréquence est sa rapidité d'acquisition, parfaitement adaptée au suivi spatio-temporel. Cependant, le niveau de fluorescence doit être suffisamment élevé pour que l'on puisse effectuer les mesures de déphasage et de démodulation rapidement. Des expériences spécifiques comparant les techniques de TCSPC et de phase et modulation pourraient mettre en exergue les avantages et les inconvénients relatifs à leur application en cellules vivantes.

Jusqu'à maintenant, nos études n'ont pas porté sur la résolution temporelle de l'acquisition des déclins de fluorescence, question centrale pour mettre au point le suivi spatio-temporel de la dynamique macromoléculaire et des interactions entre macromolécules. Si l'étude de l'anisotropie

de fluorescence nécessite une double acquisition de déclin de fluorescence avec une statistique élevée, l'étude d'une variation d'efficacité de transfert par la variation de la cinétique de fluorescence ne nécessite pas obligatoirement une statistique aussi élevée que les déclinés présentés dans ce travail. Dans certaines circonstances, il suffit de compter très peu de photons pour déterminer un changement dans la cinétique de fluorescence (Schaffer et al., 1999). De plus, dans un avenir proche, nous espérons pouvoir détecter la "montée" due au FRET dans la cinétique de fluorescence de l'accepteur. Cette approche permettrait une meilleure sensibilité au signal de FRET en cellules vivantes en le discriminant plus efficacement de l'autofluorescence cellulaire.

Pour mettre au point ce suivi spatio-temporel, le développement à court terme consiste à monter le détecteur QA présenté chapitre III. 1. 3 sur le microscope afin d'étendre la méthodologie TCSPC à une imagerie bi-dimensionnelle. De nombreuses mises au point comme l'illumination laser plein champ homogène ou l'optimisation de la réponse de la photodiode ont déjà été menées. Outre la résolution spatiale bi-dimensionnelle et la corrélation temporelle du détecteur QA, chaque photon compté sera également caractérisé par sa date d'acquisition. Ainsi, ce détecteur permet de mesurer simultanément des doubles cinétiques de la fluorescence, celle du déclin de fluorescence (quelques nanosecondes) et celle des variations spatiale et temporelle de la fluorescence pouvant s'étaler de quelques millisecondes à plusieurs heures selon les processus biologiques concernés. C'est un outil particulièrement adapté à une acquisition séquentielle à résolution spatiale sub-cellulaire de la mesure de FRET.

L'aspect tri-dimensionnel de l'espace cellulaire restera à obtenir, ceci par microscopie bi-photonique. L'excitation moléculaire par absorption simultanée de deux photons a été introduite en microscopie confocale par W. Webb et son équipe (Denk et al., 1990). Il existe trois avantages inhérents à l'application de cette méthodologie en microscopie :

(i) La dépendance quadratique du processus physique de l'absorption bi-photonique en fonction de l'intensité d'excitation confine cette absorption à la région focale. La fluorescence sera émise uniquement à partir de cette région, créant les conditions d'une imagerie confocale inhérente à ce

mode d'excitation et ne nécessitant pas de pinhole à l'émission comme en microscopie confocale un-photon.

(ii) La profondeur de pénétration de l'excitation bi-photonique (proche infra-rouge pour les fluorophores absorbant dans le visible) dans les milieux diffusants est d'environ 400 μm et permet de travailler sur les embryons (Periasamy et al., 1999), les tissus (Parasassi et al., 2000) et même sur animaux vivants (Charpak et al., 2001, Svoboda et al., 1997).

(iii) Les processus photodynamiques tels que la destruction irréversible des molécules fluorescentes ou la production de radicaux libres ne se produisent qu'à la région focale. Cette propriété minimise sensiblement l'invasivité de la microscopie bi-photonique comparativement à la microscopie confocale un-photon.

Une source pulsée femtoseconde est nécessaire pour obtenir une puissance d'excitation suffisante à ce mode d'excitation. La récente introduction de microscopes deux-photons commerciaux rend cette méthodologie accessible à un grand nombre de groupes de recherche (Piston, 1999).

Le FLIM par excitation bi-photonique a fait l'objet de développements en utilisant la méthode de phase et modulation (So et al., 1995). Néanmoins, la microscopie bi-photonique conventionnelle utilise le balayage galvanométrique d'un unique faisceau laser. Ce balayage est trop lent par rapport à l'imagerie de déclin de fluorescence que nous développons et qui permet d'acquérir les déclins simultanément en différents points de l'image. Récemment, S. Hell et son équipe ont introduit une microscopie multi-focale pour l'excitation multi-photonique (Bewersdorf et al., 1998). Une roue tournante de micro-lentilles partage le faisceau d'un laser Ti:Sa en un réseau de faisceaux qui est alors transformé en un réseau de point focaux dans le plan objet. Cette technologie permet une excitation bi-photonique quasi simultanée de tout le champ (225 balayages par seconde). Elle a été utilisée avec une caméra CCD à obturateur très rapide. Ainsi, une imagerie tri-dimensionnelle des durées de vie de fluorescence a été obtenue (Straub & Hell, 1998). La perspective de développement du microscope-QA consiste à adapter cette roue de microlentilles pour un suivi tri-dimensionnel des déclins de fluorescence par comptage de photons uniques. Une

source pulsée femtoseconde nécessaire à l'obtention de l'absorption bi-photonique sera utilisée pour les acquisitions corrélées en temps.

A plus long terme, on peut imaginer trois axes de développements de notre prototype pour étudier la dynamique de complexes macromoléculaires dans un contexte *in vivo*.

(i) La combinaison avec la méthode de FRAP dans des expériences de suivi des interactions entre protéines devrait permettre de caractériser la dynamique de ces interactions. Après avoir induit le photoblanchiment de l'accepteur (perturbation rapide par un laser externe), en sélectionnant rapidement l'excitation de l'accepteur et celle du donneur, il devrait être possible de suivre en parallèle la réapparition de la fluorescence de l'accepteur, caractérisant sa diffusion, et la réapparition du transfert d'énergie par le déclin de fluorescence du donneur, caractérisant la dynamique de l'interaction étudiée. Une autre approche consisterait à suivre la cinétique de fluorescence de l'accepteur : la fluorescence totale devrait permettre de mesurer la diffusion de l'accepteur et la "montée" dans la cinétique de fluorescence devrait permettre, elle, de déterminer la proportion de protéines acceptrices interagissant avec la protéine donneuse. Combiner ces deux approches (FRAP et FRET) permettrait ainsi de déterminer l'étape limitante de l'interaction protéine-protéine étudiée (diffusion ou cinétique d'association).

(ii) La sensibilité de détection du QA associée à la résolution tri-dimensionnelle de l'excitation bi-photonique pourrait permettre d'effectuer des mesures de FCS. Avec la date d'acquisition de chaque photon compté par le QA, on est en mesure de caractériser l'autocorrélation des fluctuations de la fluorescence. Cette autocorrélation est particulièrement adaptée à l'étude de la dynamique de diffusion de complexes fluorescents. De plus, il devrait être possible de combiner la FCS avec l'étude d'interactions spécifiques au sein de ce complexe. Ces interactions seraient mesurées par FRET en utilisant les déclins de fluorescence acquis par le QA simultanément aux fluctuations de fluorescence.

(iii) Le développement d'une imagerie par génération de second harmonique (SHG pour Second Harmonic Generation) est très récent (Campagnola et al., 1999, Moreaux et al., 2001). Ce phénomène non-linéaire correspond à la transformation de l'énergie de deux photons incidents par

diffusion d'un photon dont la fréquence est doublée. Par exemple, un ensemble de molécules présentant une orientation moyenne de leurs dipôles électroniques pourrait générer un signal de second harmonique. La SHG permettrait donc de sonder l'organisation spatiale des molécules à des échelles différentes du FRET. La microscopie de génération de second harmonique et la microscopie de fluorescence multi-photonique peuvent être couplées puisque le mode d'excitation par un laser femtoseconde est le même. Leur adaptabilité pour des études *in vivo* requiert donc le même laser. La discrimination du rayonnement SHG par rapport à la fluorescence requiert une sélection spectrale et/ou une sélection temporelle (la diffusion est instantanée alors que la fluorescence présente un déclin). Le détecteur QA permet une discrimination temporelle en mode image de ces deux phénomènes. Il semble particulièrement intéressant de pouvoir suivre simultanément l'efficacité de génération de second harmonique et les déclins de fluorescence provenant de molécules identiques ou différentes dans des études *in vivo*.

En conclusion, les études décrites dans les chapitres IV et V ont permis de démontrer l'adaptabilité de l'imagerie des déclins de fluorescence en cellules vivantes par la technique du comptage de photons uniques corrélés en temps comme outil pour étudier la dynamique macromoléculaire et les interactions entre macromolécules. Les potentialités de développement sont prometteuses. Cet outil ouvre de nombreuses perspectives pour l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu dans le fonctionnement du vivant et leur régulation.

Chapitre VII : Matériels et méthodes

VII. 1. Chimie et biologie

VII. 1. 1. Solutions fluorescentes pour les expériences in vitro

Toutes les mesures en solution à l'aide des systèmes DL ou confocal ont été effectuées en utilisant des chambres Lab-Tek (Nunc, IL, USA).

VII. 1. 1. 1. Solution de rhodamine

Le chlorure de rhodamine 6G (Molecular Probes Europe, Leiden, Pays-Bas) et le 1-butanol (Aldrich, St Quentin Fallavier, France) ont été utilisés de manière à travailler à des concentrations de l'ordre 10^{-5} M pour éviter un éventuel homotransfert.

VII. 1. 1. 2. Solution de GFP

La EGFP, provenant du laboratoire de J. C. Nicolas, a été extraite et purifiée à partir de bactéries transformées par un plasmide pEGFP (Clontech). Elle est utilisée en solution HBSS tamponnée par l'HEPES à 20 mM.

VII. 1. 1. 3. Solution ADN – bromure d'éthidium

Pour les mesures de fluorescence de l'éthidium en présence d'ADN nu, une solution constituée d'ADN de phage (Pharmacia Biotech Europe, Orsay, France) à 50 $\mu\text{g/ml}$ et de bromure d'éthidium (Molecular Probes Europe, Leiden, Pays-Bas) à 0,5 ou 4 $\mu\text{g/ml}$ a été utilisée. Le rapport éthidium/paire de base était de 1/15 pour les mesures de durée de vie et inférieur à 1/150 pour les mesures d'anisotropie de manière à empêcher l'homotransfert.

VII. 1. 1. 4. Solution ARN^{t^{phe}} – bromure d'éthidium

L'ARN de transfert phénylalanine de levure (Sigma, St Louis, MO USA) a été solubilisée (120 μM) dans 20 mM d'HEPES, 8 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de EDTA et 100 mM de KCl (pH = 7), sans purification supplémentaire, en présence de bromure d'éthidium (Molecular Probes) dont la

concentration varie de 33 à 478 μM . Pour les études de l'influence du solvant sur la fluorescence de l'éthidium, soit deux concentrations de MgCl_2 (10 et 20 mM), soit des concentrations variables de NaCl (de 0 à 900 mM) ont été utilisées.

VII. 1. 2. Plasmides recombinants

VII. 1. 2. 1. Plasmides XFP et DsRed

Les plasmides utilisés pour les transfections de protéines fluorescentes seules ou pour la construction de plasmides recombinants proviennent tous de chez Clontech. Les plasmides, pEBFP, pECFP, pEGFP, pEYFP et pDsRed sont soit -N1, soit -C1 suivant qu'ils sont utilisés pour la construction d'une protéine de fusion en N ou en C-terminal.

VII. 1. 2. 2. Plasmides recombinants p45, MafG et PC

Les constructions ont été effectuées par l'équipe de V. Mignotte (Hôpital Cochin, Paris). Le plasmide recombinant pEGFP-p45 code pour la protéine de fusion GFP-p45 qui est constituée de la séquence EGFP, de 16 acides aminés puis de la séquence complète de p45. Le plasmide recombinant pDsRed-MafG code pour la protéine de fusion DsRed-MafG qui est constituée de la séquence DsRed, de 19 acides aminés puis de la séquence complète de MafG. Le plasmide recombinant pDsRed-PC code pour la protéine de fusion DsRed-PC qui est constituée de la séquence DsRed, de 24 acides aminés puis de la séquence complète de PC. Le plasmide recombinant pPC-DsRed code pour la protéine fusion PC-DsRed qui est constituée de la séquence complète de PC, de 11 acides aminés puis de la séquence de la DsRed.

VII. 1. 2. 3. Plasmides recombinants TK

Les constructions ont été effectuées par I. Gautier au laboratoire. Les plasmides recombinants pTK₃₆₆XFP codent pour les protéines fusions TK₃₆₆XFP qui sont constituées des 366 premiers acides aminés de la séquence TK suivis de la séquence XFP (EBFP, EGFP, ECFP, EYFP ou DsRed) puis des 10 derniers acides aminés de la TK.

Les plasmides recombinants pTK₂₁₀GFP et pTK₂₇GFP codent pour les protéines TK₂₁₀GFP et TK₂₇GFP qui sont constituées des 210 et 27 premiers acides aminés de la TK suivis de la séquence EGFP, respectivement.

VII. 1. 3. Cellules

VII. 1. 3. 1. Cultures cellulaires

Les différentes lignées cellulaires adhérentes utilisées sont : les cellules HeLa, lignée cellulaire provenant d'un cancer de l'utérus humain ; les cellules Vero, cellules transformées provenant de rein de singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*) ; les cellules S2, expansion clonale d'une lignée cellulaire Vero transformée (Gao & Knipe, 1989), ces cellules sont très semblables aux cellules Vero ; les cellules C2, cellules de muscle de souris, qui fusionnent et forment des myotubes lorsqu'elles sont confluentes ; les cellules COS-7 qui proviennent également de rein du singe vert africain *Cercopithecus aethiops*, cette lignée cellulaire dérive de la lignée CV-1 par transformation avec un mutant du virus SV40 (Simian virus 40), déficient en origine de réplication, mais code pour l'antigène T (AgT) sauvage, qui est le facteur nécessaire à la réplication origine-dépendante du virus. Toutes ces cellules sont efficacement transfectées. La transfection des cellules COS-7 par des vecteurs contenant l'origine de réplication de SV40 permet leur réplication et donc la synthèse de 100 à 1000 copies de ces vecteurs par cellule.

Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂ dans du DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplémentées par 10% de sérum de veau foetal. Pour les observations au microscope, les cellules sont cultivées sur des lamelles de 32 ou 44 mm de diamètre (H. Saur, Reutlingen, Allemagne). Les lamelles sont montées dans une chambre d'observation ouverte (H. Saur ou Leica, France) et, après ricage de la monocouche cellulaire avec du HBSS tamponée par de l'HEPES, elles sont observées en présence soit d'HBSS + 20mM d'HEPES, soit de DMEM sans rouge de phénol (le rouge de phénol fluoresce dans le visible) et également tamponé par de l'HEPES (10 mM).

Les neurones, obtenus par dissection de cerveaux de rat nouveau-né, ont été mis en culture par B. Alinquant (ENS, Paris) dans un milieu spécifique.

VII. 1. 3. 2. Transfections

Les cellules ont été transfectées (i) par 8 μ l de LipofectAMINE™ Reagent (Life Technologies) et 1 μ g d'ADN par boîte de Petri de 60 mm de diamètre (lamelles de 44 mm), (ii) par 3 μ l FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals) et 2 μ g d'ADN par boîte de Petri de 35 mm de diamètre (lamelles de 32 mm), et (iii) par précipitation de l'ADN plasmidique par le phosphate de calcium suivi d'un choc chimique (DMSO, PEG, ...) pour faire entrer les précipitats dans la cellule. Les deux premières techniques, correspondant à des techniques semblables de formation de liposomes pour permettre au plasmide de passer la bicouche cytoplasmique, ont été utilisées selon les recommandations des fabricants.

VII. 1. 3. 3. Marquage avec l'éthidium

Les cellules, cultivées sur lamelles, sont incubées avec du bromure d'éthidium (0,1 à 100 μ g/ml) dans le milieu de culture pendant 30 minutes à 37°C. Les lamelles sont observées avec du HBSS + 20mM Hépès en présence de la même concentration d'éthidium que pendant l'incubation ou en absence d'éthidium.

Pour les études de perméabilisation, les cellules sont préincubées simultanément avec 1 μ g/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes) et 4 μ g/ml de bromure d'éthidium pendant 30 minutes à 37°C. La perméabilisation est effectuée à température ambiante en ajoutant de la digitonine au milieu d'observation pour obtenir une concentration finale de 50 μ g/ml.

VII. 2. Microscopie

VII. 2. 1. Microscopie de fluorescence stationnaire

VII. 2. 1. 1. Microscope

Les images d'épifluorescence sont obtenues à la température ambiante sur des cellules vivantes en utilisant un microscope inversé Leica DMIRBE (Rueil Malmaison, France). La source d'excitation est une lampe à vapeur de mercure de 50 W. Des filtres de densité optique différente (DO = 1,3 ou 2) sont utilisés pour travailler à bas niveau de lumière lorsque cela est requis. Les cellules, montées dans une chambre d'observation ouverte, sont observées à travers un objectif ultrafluor (x100, ON = 0,8 – 1,3). Le détecteur est une caméra CCD refroidie à balayage lent de 1024 x1024 pixels numérisée sur 4096 niveaux de gris (SILAR, St Petersburg, Russie). Les blocs dichroïques utilisés sont spécifiés dans les résultats.

VII. 2. 1. 2. Quantification et traitement de l'image

Pour la quantification d'images, le bruit est soustrait et une correction de l'homogénéité de la lumière d'excitation sur tout le champ de la caméra est effectuée comme décrit par ailleurs (Coppey-Moisan et al., 1994) en utilisant le logiciel Khoros (Khoral Research, Albuquerque, NM, USA). Les intensités des images sont alors quantifiées en utilisant les valeurs de niveau de gris des pixels.

Pour la visualisation, les niveaux de gris d'acquisition sont échantillonnés sur 256 niveaux pour générer des images 8 bits. Pour les images de colocalisation, le logiciel Khoros a été utilisé pour construire des images RVB, en sélectionnant l'image DsRed ou YFP comme image Rouge, l'image GFP ou CFP comme image Verte et en superposant les deux images Rouge et Verte pour la colocalisation. Il convient de préciser que les images obtenues sont des outils d'illustration et ne correspondent pas à une quantification.

VII. 2. 2. Microscopie de déclin de fluorescence

VII. 2. 2. 1. Montage confocal

Voir chapitre III. 2. 1.

VII. 2. 2. 2. Montage DL

Voir chapitre III. 2. 2.

VII. 2. 2. 3. Analyse des données

Voir chapitre III. 3.

Le logiciel Khoros a été utilisé pour manipuler les histogrammes de l'acquisition DL et générer des fichiers dans un format compatible avec le logiciel Globals Unlimited (Urbana, USA) ou pour normaliser les déclin de l'anisotropie.

Références

A

- Allison, S. A. & Schurr, J. M. (1979). Torsion dynamics and depolarization of fluorescence of linear macromolecules. I. Theory and application to DNA. *Chem Phys* **41**, 35-59.
- Andrews, N. C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M. B., Tempst, P. & Orkin, S. H. (1993). Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* **362**, 722-8.
- Angerer, L. M. & Moudrianakis, E. N. (1972). Interaction of ethidium bromide with whole and selectively deproteinized deoxynucleoproteins from calf thymus. *J Mol Biol* **63**, 505-21.
- Arents, G. & Moudrianakis, E. N. (1993). Topography of the histone octamer surface : Repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 10489-93.
- Ashraf, S. I. & Ip, Y. T. (1998). Transcriptional control: repression by local chromatin modification. *Curr Biol* **8**, R683-6.
- Axelrod, D. (1979). Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys J* **26**, 557-74.
- Axelrod, D. (1989). Fluorescence polarization microscopy. *Methods Cell Biol* **30**, 333-52.
- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. L. & Webb, W. W. (1976). Mobility measurements by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**, 1055-69.

B

- Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11984-9.
- Baker, T. A. & Bell, S. P. (1998). Polymerases and replisome: machines within machines. *Cell* **92**, 295-305.
- Barkley, M. D. & Zimm, B. H. (1979). Theory of twisting and bending of chain macromolecules; analysis of the fluorescence depolarization of DNA. *J Chem Phys* **70**, 2991-3007.
- Bastiaens, P. I. & Jovin, T. M. (1996). Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8407-12.
- Bastiaens, P. I. & Squire, A. (1999). Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol* **9**, 48-52.
- Bastiaens, P. I., van Hoek, A., Benen, J. A., Brochon, J. C. & Visser, A. J. (1992). Conformational dynamics and intersubunit energy transfer in wild-type and mutant lipamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. A multidimensional time-resolved polarized fluorescence study. *Biophys J* **63**, 839-53.
- Baumann, J. & Fayer, M. D. (1986). Excitation transfer in disordered two-dimensional and anisotropic three-dimensional systems: effects of spatial geometry on time-resolved observables. *J Chem Phys* **85**, 4087-107.
- Beechem, J. M., Gratton, E., Ameloot, M., Knutson, J. R. & Brand, L. (1991). The global analysis of fluorescence intensity and anisotropy decay data: second-generation theory and programs. In *Topics in fluorescence spectroscopy, Volume 2: Principles*. Edited by J. R. Lakowicz. New York: Plenum Press.
- Berberan-Santos, M. N. & Valeur, B. (1991). Fluorescence depolarization by electronic energy transfer in donor-acceptor pairs of like and unlike chromophores. *J Chem Phys* **95**, 8048-55.

- Bergström, F., Hägglöf, P., Karolin, J., Ny, T. & Johansson, L. B.-A. (1999). The use of site-directed fluorophore labeling and donor-donor energy migration to investigate solution structure and dynamics in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12477-81.
- Berland, K. M., So, P. T. & Gratton, E. (1995). Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophys J* **68**, 694-701.
- Bewersdorf, J., Pick, R. & Hell, S. W. (1998). Multifocal multiphoton microscopy. *Opt Lett* **23**, 655-7.
- Bird, A. P. & Wolffe, A. P. (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-4.
- Blackman, S. M., Piston, D. W. & Beth, A. H. (1998). Oligomeric state of human erythrocyte band 3 measured by fluorescence resonance energy homotransfer. *Biophys J* **75**, 1117-30.
- Blank, V. & Andrews, N. C. (1997). The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci* **22**, 437-41.
- Brochon, J.-C. (1994). Maximum entropy method of data analysis in time-resolved spectroscopy. *Methods Enzymol* **240**, 262-311.
- Brown, D. G., Visse, R., Sandhu, G., Davies, A., Rizkallah, P. J., Melitz, C., Summers, W. C. & Sanderson, M. R. (1995). Crystal structures of the thymidine kinase from herpes simplex virus type-1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir. *Nat Struct Biol* **2**, 876-81.

C

- Campagnola, P. J., Wei, M. D., Lewis, A. & Loew, L. M. (1999). High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation. *Biophys J* **77**, 3341-9.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical chemistry II*. San Francisco: W. H. Freeman and company.
- Carey, M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* **92**, 5-8.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-5.
- Charpak, S., Mertz, J., Beaurepaire, E., Moreaux, L. & Delaney, K. (2001). Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1230-4.
- Chattoraj, M., King, B. A., Bublitz, G. U. & Boxer, S. G. (1996). Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8362-7.
- Chu, W. C., Liu, J. C. & Horowitz, J. (1997). Localization of the major ethidium bromide binding site on tRNA. *Nucleic Acids Res* **25**, 3944-9.
- Clegg, R. M. (1992). Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol* **211**, 353-88.
- Clendenning, J. B., Naimushin, A. N., Fujimoto, B. S., Stewart, D. W. & Schurr, J. M. (1994). Effect of ethidium binding and superhelix density on the supercoiling free energy and torsion and bending constants of p30 delta DNA. *Biophys Chem* **52**, 191-218.
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212-8.
- Coppey-Moisan, M., Brunet, A. C., Morais, R. & Coppey, J. (1996). Dynamical change of mitochondrial DNA induced in the living cell by perturbing the electrochemical gradient. *Biophys J* **71**, 2319-28.
- Coppey-Moisan, M., Delic, J., Magdelenat, H. & Coppey, J. (1994). Principle of digital imaging microscopy. *Methods Mol Biol* **33**, 359-93.
- Cramer, E. M. (1999). Megakaryocyte structure and function. *Curr Opin Hematol* **6**, 354-61.
- Creemers, T. M. H., Lock, A. J., Subramaniam, V., Jovin, T. M. & Völker, S. (2000). Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2974-2978.

Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**, 448-55.

D

- Dale, R. E., Eisinger, J. & Blumberg, W. E. (1979). The orientational freedom of molecular probes : the orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* **26**, 161-194.
- Dayel, M. J., Hom, E. F. Y. & Verkman, A. S. (1999). Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum. *Biophys J* **76**, 2843-51.
- Degreve, B., Esnouf, R., De Clercq, E. & Balzarini, J. (1999). Characterization of multiple nuclear localization signals in herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 338-42.
- Degreve, B., Johansson, M., De Clercq, E., Karlsson, A. & Balzarini, J. (1998). Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinases (TKs) in TK gene-transfected tumor cells: molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK. *J Virol* **72**, 9535-43.
- Delic, J., Coppey, J., Ben Saada, M., Magdelénat, H. & Coppey-Moisán, M. (1992). Probing the nuclear DNA in living cell with fluorescent intercalating dyes. *J Cell Pharmacol* **3**, 126-31.
- Delic, J., Coppey, J., Magdelénat, H. & Coppey-Moisán, M. (1991). Impossibility of acridine orange intercalation in nuclear DNA of the living cell. *Exp Cell Res* **194**, 147-53.
- Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73-6.
- Deveaux, S., Cohen-Kaminsky, S., Shivdasani, R. A., Andrews, N. C., Filipe, A., Kuzniak, I., Orkin, S. H., Romeo, P. H. & Mignotte, V. (1997). p45 NF-E2 regulates expression of thromboxane synthase in megakaryocytes. *Embo J* **16**, 5654-61.
- Dowling, K., Dayel, M. J., Lever, M. J., French, P. M. W., Hares, J. D. & Dymoke-Bradshaw, A. K. L. (1998). Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications. *Optics letters* **23**, 810-2.
- Durieux, C., Brunet, A. C., Geeraert, V., Coppey, J. & Coppey-Moisán, M. (1999). A transient decrease of electrochemical gradient stabilizes DNA structural change in single mitochondria of living cells. *Biol Cell* **91**, 597-604.

E

- Echols, H. (1986). Multiple DNA-protein interactions governing high-precision DNA transactions. *Science* **233**, 1050-6.
- Ehrenberg, M., Rigler, R. & Wintermeyer, W. (1979). On the structure and conformational dynamics of yeast phenylalanine-accepting transfer ribonucleic acid in solution. *Biochemistry* **18**, 4588-99.
- Elson, E. L. & Magde, D. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**, 1-27.

F

- Favard, C., Pager, J., Locker, D. & Vigny, P. (1997). Incorporation of ethidium bromide in the *Drosophila* salivary gland approached by microspectrofluorometry : evidence for the presence of both free and bound dye in the nuclei of cells in viable conditions. *Euro Biophys J* **25**, 225-37.
- Fetzer, J., Michael, M., Bohner, T., Hofbauer, R. & Folkers, G. (1994). A fast method for obtaining highly pure recombinant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Protein Expr Purif* **5**, 432-41.

- Folkers, G., Trumpp-Kallmeyer, S., Gutbrod, O., Krickl, S., Fetzner, J. & Keil, G. M. (1991). Computer-aided active-site-directed modeling of the herpes simplex virus 1 and human thymidine kinase. *J Comput Aided Mol Des* **5**, 385-404.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.* **2**, 55-75.
- Fradkov, A. F., Chen, Y., Ding, L., Barsova, E. V., Matz, M. V. & Lukyanov, S. A. (2000). Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possess a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett* **479**, 127-30.

G

- Gao, M. & Knipe, D. M. (1989). Genetic evidence for multiple nuclear functions of the herpes simplex virus ICP8 DNA-binding protein. *J Virol* **63**, 5258-67.
- Gennerich, A. & Schild, D. (2000). Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used. *Biophys J* **79**, 3294-306.
- Gochanour, C. R. & Fayer, M. D. (1981). Electronic excited-state transport in random systems. Time-resolved fluorescence depolarization measurements. *J Phys Chem* **85**, 1989-94.
- Goedhart, J., Hink, M. A., Visser, A. J., Bisseling, T. & Gadella, T. W. (2000). In vivo fluorescence correlation microscopy (FCM) reveals accumulation and immobilization of Nod factors in root hair cell walls. *Plant J* **21**, 109-19.
- Gratton, E. & Limkeman, M. (1983). A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution. *Biophys J* **44**, 315-24.
- Gross, L. A., Baird, G. S., Hoffman, R. C., Baldrige, K. K. & Tsien, R. Y. (2000). The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11990-5.
- Grosschedl, R. (1995). Higher-order nucleoprotein complexes in transcription: analogies with site-specific recombination. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 362-70.
- Guest, C. R., Hochstrasser, R. A., Dupuy, C. G., Allen, D. J., Benkovic, S. J. & Millar, D. P. (1991). Interaction of DNA with the Klenow fragment of DNA polymerase I studied by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 8759-70.

H

- Haarr, L. & Flatmark, T. (1987). Evidence that deletion of coding sequences in the 5' end of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 affects the stability of the gene products. *J Gen Virol* **68**, 2817-29.
- Haarr, L., Marsden, H. S., Preston, C. M., Smiley, J. R., Summers, W. C. & Summers, W. P. (1985). Utilization of internal AUG codons for initiation of protein synthesis directed by mRNAs from normal and mutant genes encoding herpes simplex virus-specified thymidine kinase. *J Virol* **56**, 512-9.
- Härd, T. & Kearns, D. R. (1990). Reduced DNA flexibility in complexes with a type II DNA binding protein. *Biochemistry* **29**, 959-65.
- Harpur, A. G., Wouters, F. S. & Bastiaens, P. I. (2001). Imaging FRET between spectrally similar GFP molecules in single cells. *Nat Biotechnol* **19**, 167-9.
- Hayashi, J.-I., Takemitsu, M., Goto, Y.-I. & Nonaka, I. (1994). Human mitochondria and mitochondrial genome function as a single dynamic cellular unit. *J Cell Biol* **125**, 43-50.
- Hazlett, T. L., Johnson, A. E. & Jameson, D. M. (1989). Time-resolved fluorescence studies on the ternary complex formed between bacterial elongation factor Tu, Guanosine 5'-triphosphate, and phenylalanyl-tRNA^{phe}. *Biochemistry* **28**, 4109-17.
- Heath, P. J., Clendenning, J. B., Fujimoto, B. S. & Schurr, J. M. (1996). Effect of bending strain on the torsion elastic constant of DNA. *J Mol Biol* **260**, 718-30.
- Heikal, A. A., Hess, S. T., Baird, G. S., Tsien, R. Y. & Webb, W. W. (2000). Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11996-2001.

- Heim, R. (1999). Green fluorescent protein forms for energy transfer. *Methods Enzymol* **302**, 408-23.
- Heim, R., Cubitt, A. B. & Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-4.
- Heim, R. & Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**, 178-82.
- Hernandez, L. I., Zhong, M., Courtney, S. H., Marky, L. A. & Kallenbach, N. R. (1994). Equilibrium analysis of ethidium binding to DNA containing base mismatches and branches. *Biochemistry* **33**, 13140-6.
- Herzberg, M., Bibor-Hardy, V. & Simard, R. (1981). Herpes specific and alpha DNA polymerase in nuclear envelope of BHK infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* **100**, 644-50.
- Hink, M. A., Griep, R. A., Borst, J. W., van Hoek, A., Eppink, M. H. M., Schots, A. & Visser, A. J. W. G. (2000). Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *J Biol Chem* **275**, 17556-60.
- Hogan, M. E., Rooney, T. F. & Austin, R. H. (1987). Evidence for kinks in DNA folding in the nucleosome. *Nature* **328**, 554-7.
- Honda, A., Adams, S. R., Sawyer, C. L., Lev-Ram, V., Tsien, R. Y. & Dostmann, W. R. (2001). Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescence indicator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2437-42.

I

- Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. & Yamamoto, M. (1994). Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* **367**, 568-72.
- Irmiere, A. F., Manos, M. M., Jacobson, J. G., Gibbs, J. S. & Coen, D. M. (1989). Effect of an amber mutation in the herpes simplex virus thymidine kinase gene on polypeptide synthesis and stability. *Virology* **168**, 210-20.

J

- Jablonski, A. (1935). Über den mechanismus des photolumineszenz von farbstoffphosphoren. *Z. Phys.* **94**, 38-46.
- Jacobson, K. (1999). Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol* **9**, 87-91.
- Jacobson, K., Derzko, Z., Wu, E. S., Hou, Y. & Poste, G. (1976). Measurement of the lateral mobility of cell surface components in single, living cells by fluorescence recovery after photobleaching. *J Supramol Struct* **5**, 565-76.
- Jacobson, S. & Pillus, L. (1999). Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 175-84.
- Jakobs, S., Subramaniam, V., Schonle, A., Jovin, T. M. & Hell, S. W. (2000). EFGP and DsRed expressing cultures of Escherichia coli imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett* **479**, 131-5.
- Jameson, D. M. & Seifried, S. E. (1999). Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods* **19**, 222-33.
- Jones, C. R. & Kearns, D. R. (1975). Identification of a unique ethidium bromide binding site on yeast tRNAPhe by high resolution (300 MHz) nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **14**, 2660-5.
- Jones, P. A. & Laird, P. W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* **21**, 163-7.
- Jupe, E. R., Sinden, R. R. & Cartwright, I. L. (1993). Stably maintained microdomain of localized unrestrained supercoiling at a Drosophila heat shock gene locus. *EMBO J* **12**, 1067-75.

K

- Karolin, J., Fa, M., Wilczynska, M., Ny, T. & Johansson, L. B.-A. (1998). Donor-donor energy migration for determining intramolecular distances in proteins: I. Application of a model to the latent plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *Biophys J* **74**, 11-21.
- Kemnitz, K., Pfeifer, L., Paul, R. & Coppey-Moisan, M. (1997). Novel detectors for fluorescence lifetime imaging on the picosecond time scale. *J Fluor* **7**, 93-8.
- Kemnitz, K., Pfeifer, L., Paul, R., Fink, F. & Bergmann, A. (1995). Time- and space-correlated single photon counting spectroscopy. *Proc SPIE* **2628**, 2.
- Knutson, J. R., Davenport, L. & Brand, L. (1986). Anisotropy decay associated fluorescence spectra and analysis of rotational heterogeneity. 1. Theory and applications. *Biochemistry* **25**, 1805-10.

L

- Lakowicz, J. R. (1983). Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press.
- Lakowicz, J. R., Szmajcinski, H., Nowaczyk, K. & Johnson, M. L. (1992). Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1271-5.
- Lamond, A. I. & Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* **280**, 547-53.
- Larsen, R. W., Jasuja, R., Hetzler, R. K., Muraoka, P. T., Andrada, V. G. & Jameson, D. M. (1996). Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators. *Biophys J* **70**, 443-52.
- Lavalette, D., Tétreau, C., Tourbez, M. & Blouquit, Y. (1999). Microscopic viscosity and rotational diffusion of proteins in a macromolecular environment. *Biophys J* **76**, 2744-51.
- Leuba, S. H., Bustamante, C., Zlatanova, J. & van Holde, K. (1998). Contributions of linker histones and histone H3 to chromatin structure : scanning force microscopy studies on trypsinized fibers. *Biophys J* **74**, 2823-9.
- Li, H. Y., Ng, E. K., Lee, S. M., Kotaka, M., Tsui, S. K., Lee, C. Y., Fung, K. P. & Waye, M. M. (2001). Protein-protein interaction of FHL3 with FHL2 and visualization of their interaction by green fluorescent proteins (GFP) two-fusion fluorescence resonance energy transfer (FRET). *J Cell Biol* **80**, 293-303.
- Liu, Q. Y. & Summers, W. C. (1988). Site-directed mutagenesis of a nucleotide-binding domain in HSV-1 thymidine kinase: effects on catalytic activity. *Virology* **163**, 638-42.
- Llopis, J., Westin, S., Ricote, M., Wang, Z., Cho, C. Y., Kurokawa, R., Mullen, T. M., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., Tsien, R. Y., Glass, C. K. & Wang, J. (2000). Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Aug 15;97(17):9819]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4363-8.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-60.

M

- Macgregor, J., R. B., Clegg, R. M. & Jovin, T. M. (1987). Viscosity dependence of ethidium-DNA intercalation kinetics. *Biochemistry* **26**, 4008-16.
- Mahajan, N. P., Linder, K., Berry, G., Gordon, G. W., Heim, R. & Herman, B. (1998). Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence energy transfer. *Nat Biotechnol* **16**, 547-52.
- Manders, E. M. M., Kimura, H. & Cook, P. R. (1999). Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation. *J Cell Biol* **144**, 813-21.

- Marsden, H. S., Haarr, L. & Preston, C. M. (1983). Processing of herpes simplex virus proteins and evidence that translation of thymidine kinase mRNA is initiated at three separate AUG codons. *J Virol* **46**, 434-45.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. & Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [see comments] [published erratum appears in *Nat Biotechnol* 1999 Dec;17(12):1227]. *Nat Biotechnol* **17**, 969-73.
- McMurray, C. T. & van Holde, K. E. (1991). Binding of ethidium to the nucleosome core particle. I. Binding and dissociation reactions. *Biochemistry* **30**, 5631-43.
- Meiners, J. C. & Quake, S. R. (2000). Femtonewton force spectroscopy of single extended DNA molecules. *Phys Rev Lett* **84**, 5014-7.
- Meyer-Almes, F. J. & Porschke, D. (1993). Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. *Biochemistry* **32**, 4246-53.
- Mignotte, V., Eleouet, J. F., Raich, N. & Romeo, P. H. (1989). Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6548-52.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-7.
- Moreaux, L., Sandre, O., Charpak, S., Blanchard-Desce, M. & Mertz, J. (2001). Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy. *Biophys J* **80**, 1568-74.

N

- Nagai, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inouye, S., Hirose, K., Iino, M. & Hagiwara, M. (2000). A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo. *Nat Biotechnol* **18**, 313-6.
- Nahmias, A. J., Keyserling, H. & Lee, F. K. (1991). Herpes Simplex Viruses 1 and 2. In *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*, third edition edn, pp. 393-417. Edited by A. S. Evans. New York and London: Plenum Medical Book Company.
- Ng, T., Shima, D., Squire, A., Bastiaens, P. I., Gschmeissner, S., Humphries, M. J. & Parker, P. J. (1999a). PKC α regulates β 1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *Embo J* **18**, 3909-23.
- Ng, T., Squire, A., Hansra, G., Bornancin, F., Prevostel, C., Hanby, A., Harris, W., Barnes, D., Schmidt, S., Mellor, H., Bastiaens, P. I. & Parker, P. J. (1999b). Imaging protein kinase Calpha activation in cells. *Science* **283**, 2085-9.
- Nickel, B. (1996). Pioneers in photochemistry: from the Perrin diagram to the Jablonski diagram. *EPA Newsletter* **58**, 9-38.

O

- O'Connor, D. V. & Phillips, D. (1984). Time-Correlated Single Photon Counting. New York: Academic Press.
- Olmsted III, J. & Kearns, D. R. (1977). Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry* **16**, 3647-54.
- Onodera, K., Shavit, J. A., Motohashi, H., Yamamoto, M. & Engel, J. D. (2000). Perinatal synthetic lethality and hematopoietic defects in compound mafG::mafK mutant mice. *Embo J* **19**, 1335-45.
- Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-5.
- Owen-Hughes, T. & Workman, J. L. (1994). Experimental analysis of chromatin function in transcription control. *Crit Revs Euk Gene Exp* **4**, 403-41.

P

- Parasassi, T., Yu, W., Durbin, D., Kuriashkina, L., Gratton, E., Maeda, N. & Ursini, F. (2000). Two-photon microscopy of aorta fibers shows proteolysis induced by LDL hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* **28**, 1589-97.
- Partikian, A., Olveczky, B., Swaminathan, R., Li, Y. & Verkman, A. S. (1998). Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix. *J Cell Biol* **140**, 821-9.
- Pepperkok, R., Squire, A., Geley, S. & Bastiaens, P. I. (1999). Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr Biol* **9**, 269-72.
- Periasamy, A., Skoglund, P., Noakes, C. & Keller, R. (1999). An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in *Xenopus* morphogenesis. *Microsc Res Tech* **47**, 172-81.
- Philips, L. A., Webb, S. P. & Clark, J. H. (1985). High-pressure studies of rotational reorientation dynamics: The role of dielectric friction. *J Chem Phys* **83**, 5810-21.
- Phizicky, E. M. & Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59**, 94-123.
- Piston, D. W. (1999). Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy. *Trends Cell Biol* **9**, 66-9.
- Preston, C. M. & McGeoch, D. J. (1981). Identification and mapping of two polypeptides encoded within the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene sequences. *J Virol* **38**, 593-605.
- Pulleyblank, D. E. & Morgan, A. R. (1975). The sense of naturally occurring superhelices and the unwinding angle of intercalated ethidium. *J Mol Biol* **91**, 1-13.

R

- Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J. & Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rates and low background: analysis of translational diffusion. *Euro Biophys J* **22**, 169-75.
- Runnels, L. W. & Scarlata, S. F. (1995). Theory and application of fluorescence homotransfer to melittin oligomerization. *Biophys J* **69**, 1569-83.
- Rydberg, B., Holley, W. R., Mian, I. S. & Chatterjee, A. (1998). Chromatin conformation in living cell: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber. *J Mol Biol* **284**, 71-84.

S

- Schaffer, J., Volkmer, A., Eggeling, C., Subramaniam, V., Striker, G. & Seidel, C. A. M. (1999). Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence anisotropy. *J Phys Chem A* **103**, 331-6.
- Schoutteten, L., Denjean, P. & Pansu, R. B. (1997). Characterization of a confocal microscope for time-resolved photon counting fluorescence. *J Fluo* **7**, 155-65.
- Schröter, H., Maier, G., Ponstingl, H. & Nordheim, A. (1985). DNA intercalators induce specific release of HMG 14, HMG 17 and other DNA-binding proteins from chicken erythrocyte chromatin. *EMBO J* **4**, 3867-72.
- Schurr, J. M. (1984). Rotational diffusion of deformable macromolecules with mean local cylindrical symmetry. *Chem Phys* **84**, 71-96.
- Schurr, J. M. & Schurr, R. L. (1985). DNA motions in the nucleosome core particle: a reanalysis. *Biopolymers* **24**, 1931-40.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F. J. & Rigler, R. (1997). Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J* **72**, 1878-86.
- Selvin, P. R. (1995). Fluorescence energy transfer. *Methods Enzymol* **246**, 300-34.

- Selvin, P. R., Scalettar, B. A., Langmore, J. P., Axelrod, D., Klein, M. P. & Hearst, J. E. (1990). A polarized photobleaching study of chromatin reorientation in intact nuclei. *J Mol Biol* **214**, 911-22.
- Shavit, J. A., Motohashi, H., Onodera, K., Akasaka, J., Yamamoto, M. & Engel, J. D. (1998). Impaired megakaryopoiesis and behavioral defects in mafG-null mutant mice. *Genes Dev* **12**, 2164-74.
- Shivdasani, R. A., Rosenblatt, M. F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C. W., Hunt, P., Saris, C. J. & Orkin, S. H. (1995). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* **81**, 695-704.
- Smith, S. B., Finzi, L. & Bustamante, C. (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* **258**, 1122-6.
- So, P. T. C., French, T., Yu, W. M., Berland, K. M., Dong, C. Y. & Gratton, E. (1995). Time-resolved fluorescence microscopy using two-photon excitation. *Bioimaging* **3**, 49-63.
- Sobell, H. M., Tsai, C. C., Gilbert, S. G., Jain, S. C. & Sakore, T. D. (1976). Organization of DNA in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 3068-72.
- Sogo, J. M., Ness, P. J., Widmer, R. M., Parish, R. W. & Koller, T. (1984). Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin. *J Mol Biol* **178**, 897-919.
- Sorkin, A., McClure, M., Huang, F. & Carter, R. (2000). Intercation of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Biol* **10**, 1395-8.
- Squire, A., Verveer, P. J. & Bastiaens, P. I. (2000). Multiple frequency fluorescence lifetime imaging microscopy. *J Microsc* **197**, 136-49.
- Steinberg, I. Z. (1971). Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides. *Annu Rev Biochem* **40**, 83-114.
- Straub, M. & Hell, S. W. (1998). Fluorescence lifetime three-dimensional microscopy with picosecond precision using a multifocal multiphoton microscope. *App Phys Lett* **73**, 1769-71.
- Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**, 819-46.
- Studitsky, V. M., Kassavetis, G. A., Geiduschek, E. P. & Felsenfeld, G. (1997). Mechanism of transcription through the nucleosome by eukaryotic RNA polymerase. *Science* **278**, 1960-3.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. & Tank, D. W. (1997). In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* **385**, 161-5.
- Swaminathan, R., Hoang, C. P. & Verkman, A. S. (1997). Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys J* **72**, 1900-7.

T

- Talbot, D. & Grosveld, F. (1991). The 5'HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *Embo J* **10**, 1391-8.
- Tanaka, F. & Mataga, N. (1979). Theory of time-dependent photo-selection in interacting fixed systems. *Photochem Photobiol* **29**, 1091-7.
- Thomas, J. C., Allison, S. A., Appellof, C. J. & Schurr, J. M. (1980). Torsion dynamics and depolarization of fluorescence of linear macromolecules. II. Fluorescence polarization anisotropy measurements on a clean viral phi 29 DNA. *Biophys Chem* **12**, 177-88.
- Thomas, J. C., Schurr, J. M., Reid, B. R., Ribeiro, N. S. & Hare, D. R. (1984). Effect of Mg²⁺ on solution conformation of two different transfer ribonucleic acids. *Biochemistry* **23**, 5414-20.
- Tichadou, J. L., Genest, D., Wahl, P. & Aubel-Sadron, G. (1975). The use of fluorescence anisotropy decay of poly d(A-T) ethidium bromide complex to estimate the unwinding angle of the double helix. *Biophys Chem* **3**, 142-6.

- Tramier, M., Gautier, I., Durieux, C., Coppey, J., Pansu, R. B., Nicolas, J.-C., Kemnitz, K. & Coppey-Moisan, M. (2001). Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophys J* **80**, sous presse.
- Tramier, M., Kemnitz, K., Durieux, C., Coppey, J., Denjean, P., Pansu, R. B. & Coppey-Moisan, M. (2000). Restrained torsional dynamics of nuclear DNA in living proliferative mammalian cells. *Biophys J* **78**, 2614-27.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44.
- Tugores, A., Magness, S. T. & Brenner, D. A. (1994). A single promoter directs both housekeeping and erythroid preferential expression of the human ferrochelatase gene. *J Biol Chem* **269**, 30789-97.
- Tyas, L., Brophy, V. A., Pope, A., Rivett, A. J. & Tavaré, J. M. (2000). Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *Embo Reports* **1**, 266-70.
- Tyler, J. K. & Kadonaga, J. T. (1999). The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell* **99**, 443-6.

V

- Valeur, B. (1993). Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters. In *Molecular luminescence spectroscopy, Part 3*, pp. 25-84. Edited by S. G. Schulman.
- Van Der Meer, B. W., Coker, G. I. & Chen, S. Y. (1994). Resonance energy transfer: theory and data. Edited by V. C. H. New York.
- van Der Wal, J., Habets, R., Varnai, P., Balla, T. & Jalink, K. (2001). Monitoring phospholipase C activation kinetics in live cells by FRET. *J Biol Chem* **on line**.
- van Holde, K. E. (1989). Chromatin. Edited by A. Rich. New-York: Springer-Verlag.
- Varma, R. & Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798-801.
- Verkman, A. S., Armijo, M. & Fushimi, K. (1991). Construction et evaluation of a frequency-domain epifluorescence microscope for lifetime and anisotropy decay measurements in subcellular domains. *Biophys Chem* **40**, 117-25.
- Verveer, P. J., Wouters, F. S., Reynolds, A. R. & Bastiaens, P. I. (2000). Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane. *Science* **290**, 1567-70.
- Volkmer, A., Subramaniam, V., Birch, D. J. S. & Jovin, T. M. (2000). One- and two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins. *Biophys J* **78**, 1589-98.

W

- Wahl, P., Paoletti, J. & Le Pecq, J. B. (1970). Decay of fluorescence emission anisotropy of the ethidium bromide-DNA complex. Evidence for an internal motion in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **65**, 417-21.
- Waldman, A. S., Haeusslein, E. & Milman, G. (1983). Purification and characterization of herpes simplex virus (type 1) thymidine kinase produced in Escherichia coli by a high efficiency expression plasmid utilizing a lambda PL promoter and cI857 temperature-sensitive repressor. *J Biol Chem* **258**, 11571-5.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotech* **17**, 691-5.
- Wall, M. A., Socolich, M. & Ranganathan, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol* **7**, 1133-8.
- Wang, J. C. (1974). The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients. *J Mol Biol* **89**, 783-801.
- Weber, G. (1953). Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions. *Adv. Protein Chem.* **8**, 415-59.

- Weber, G. (1954). Dependence of polarization of the fluorescence on the concentration. *Trans. Farad. Soc.* **50**, 552-5.
- Weber, G. & Shinitzky, M. (1970). Failure of energy transfer between identical molecules on excitation at the absorption spectrum long wave edge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **65**, 823-30.
- Wells, B. D. & Cantor, C. R. (1977). A strong ethidium binding site in the acceptor stem of most or all transfer RNAs. *Nucleic Acids Res* **4**, 1667-80.
- White, J. & Stelzer, E. (1999). Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol* **9**, 61-5.
- Widom, J. (1998). Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**, 285-327.
- Wild, K., Bohner, T., Aubry, A., Folkers, G. & Schulz, G. E. (1995). The three-dimensional structure of thymidine kinase from herpes simplex virus type 1. *FEBS Lett* **368**, 289-92.
- Wild, K., Bohner, T., Folkers, G. & Schulz, G. E. (1997). The structures of thymidine kinase from herpes simplex virus type 1 in complex with substrates and a substrate analogue. *Protein Sci* **6**, 2097-106.
- Winzeler, E. A. & Small, E. W. (1991). Fluorescence anisotropy decay of ethidium bound to nucleosome core particles. 2. The torsional motion of the DNA is highly constrained and sensitive to pH. *Biochemistry* **30**, 5304-13.
- Wouters, F. S. & Bastiaens, P. I. (1999). Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr Biol* **9**, 1127-30.
- Wouters, F. S., Bastiaens, P. I., Wirtz, K. W. & Jovin, T. M. (1998). FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *Embo J* **17**, 7179-89.
- Wu, P. G., Fujimoto, B. S., Song, L. & Schurr, J. M. (1991). Effect of ethidium on the torsion constants of linear and supercoiled DNAs. *Biophys Chem* **41**, 217-36.
- Wylczynska, M., Fa, M., Karolin, J., Ohlsson, P. I., Johansson, L. B.-A. & Ny, T. (1997). New structural insights into native serpin protease complexes reveal the inhibitory mechanism of serpins. *Nature Struct Biol* **4**, 354-7.

X

- Xia, Z., Zhou, Q., Lin, J. & Liu, Y. (2001). Stable SNARE complex prior to evoked synaptic vesicle fusion revealed by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem* **276**, 1766-71.
- Xu, X., Gerard, A. L. V., Huang, B. C. B., Anderson, D. C. & Payan, D. G. (1998). Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Res* **26**, 2034-5.
- Xu, Y., Piston, D. W. & Johnson, C. H. (1999). A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 151-6.

Y

- Yamada, S., Wirtz, D. & Kuo, S. C. (2000). Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophys J* **78**, 1736-47.
- Yao, J., Lowary, P. T. & Widom, J. (1993). Twist constraints on linker DNA in the 30-nm chromatin fiber : implications for nucleosome phasing. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9364-8.

Z

- Zolotukhin, S., Potter, M., Hausswirth, W. W., Guy, J. & Muzyczka, N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol* **70**, 4446-54.

Table des illustrations

Figure I. 1 : Le FRAP.	15
Figure I. 2 : La FCS.	16
Figure I. 3 : Spectres de fluorescence des différents variants spectraux de la GFP.	18
Figure I. 4 : Représentation de la structure tertiaire de la GFP.	19
Figure II. 1 : Diagramme de Perrin-Jablonski.	25
Figure II. 2 : Spectres d'excitation et d'émission de la GFP (S65T).	26
Figure II. 3 : Diagramme de désexcitation simplifié.	27
Figure II. 4 : Déclin de fluorescence.	30
Figure II. 5 : Diagramme des niveaux d'énergie du donneur et de l'accepteur dans un mécanisme de FRET.	31
Figure II. 6 : Le FRET vu comme réaction chimique.	32
Figure II. 7 : Diagramme simplifié du phénomène de FRET.	32
Figure II. 8 : Recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur.	33
Figure II. 9 : Signification géométrique de κ^2 , le facteur d'orientation.	34
Figure II. 10 : Variation de la durée de vie du donneur en fonction de sa distance avec l'accepteur.	36
Figure II. 11 : Modélisation théorique de la cinétique de l'accepteur dans une expérience de FRET.	37
Figure II. 12 : Représentation théorique de populations hétérogènes de chromophores dans une expérience de FRET.	41
Figure II. 13 : Représentation géométrique de la mesure d'anisotropie.	44
Figure II. 14 : Anisotropie de fluorescence d'un dipôle.	44
Figure II. 15 : Dépolarisation de la fluorescence par rotation du chromophore.	47
Figure II. 16 : Dépolarisation de la fluorescence par transfert d'énergie.	49
Figure II. 17 : Modélisation de l'ADN pour les mouvements de torsion suivant l'axe de la double hélice.	53
Figure II. 18 : Différents modèles de propagation des mouvements de torsion de l'ADN.	54
Figure III. 1 : Présentation des deux techniques de mesure des durées de vie de fluorescence (d'après Bastiaens et Squire, 1999).	56
Figure III. 2 : Histogramme des retards des photons uniques comptés.	58
Figure III. 3 : Schéma du laser Ti:Sa, du sélecteur d'impulsion et du doubleur de fréquence.	60
Figure III. 4 : Tube photo-multiplicateur conventionnel.	61
Figure III. 5 : Détecteur Delay-Line.	62
Figure III. 6 : Détecteur Quadrant-Anode.	63
Figure III. 7 : Schéma de fonctionnement de l'électronique mesurant le retard des photons comptés par rapport au pulse laser.	65

Figure III. 8 : Fonctionnement du schéma indépendant pour le détecteur DL.	65
Figure III. 9 : Fonctionnement du schéma asymétrique pour le détecteur DL.	66
Figure III. 10 : Histogramme 2D du retard et de la position des photons comptés.	67
Figure III. 11 : Chemin optique du montage confocal.	68
Figure III. 12 : Schéma général du montage confocal (Laboratoire PPSM, ENS Cachan).	69
Figure III. 13 : Schéma général du montage DL.	71
Figure III. 14 : Transformation des déclins théoriques par le système d'acquisition.	73
Figure III. 15 : Analyse globale des déclins en fonction de leur position le long du DL.	75
Figure IV. 1 : Expansion du faisceau laser à l'entrée du microscope.	77
Figure IV. 2 : Schéma du galvanomètre avant l'expansion du faisceau laser à l'entrée du microscope.	78
Figure IV. 3 : Eclairage laser sans et avec le galvanomètre.	78
Figure IV. 4 : Chemin optique pour l'acquisition de l'IRF.	79
Figure IV. 5 : Réglage du signal photodiode.	80
Figure IV. 6 : IRF optimisée obtenue sur le système DL.	82
Figure IV. 7 : Ajustement du bruit compté par le DL.	82
Figure IV. 8 : Acquisition DL de la réflexion du laser sur une règle micrométrique.	84
Figure IV. 9 : Mode opératoire pour la caractérisation de la largeur de la surface active du DL.	85
Figure IV. 10 : Acquisition cumulée de l'IRF avec différents retards introduits dans la chaîne de comptage.	86
Figure IV. 11 : Position des IRF en fonction des retards introduits dans la chaîne de comptage.	86
Figure IV. 12 : Déclin de fluorescence de la Rd6G dans le butanol mesuré par le système DL.	87
Figure IV. 13 : Variation de la durée de vie mesurée en fonction de la position spatiale.	88
Figure IV. 14 : Représentation théorique des déclins parallèles et perpendiculaires pour une anisotropie nulle aux temps longs.	89
Figure IV. 15 : Représentation théorique des déclins parallèles et perpendiculaires pour une anisotropie non nulle aux temps longs.	89
Figure IV. 16 : Chemin optique et configuration géométrique de l'anisotropie sous microscope.	91
Table IV. 1 : Comparaison des paramètres de diffusion rotationnelle de la Rd6G dans le butanol obtenus par différentes méthodes de normalisation et à différentes ON de l'objectif x 100.	93
Figure IV. 17 : Dépendance de l'anisotropie initiale, r_0 , en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif.	94
Figure IV. 18 : Spectres d'absorption et d'émission des protéines autofluorescentes.	96
Figure IV. 19 : Localisation subcellulaire de la GFP exprimée en cellules Vero.	96
Figure IV. 20 : Acquisition DL de la GFP exprimée en cellules Vero.	97
Figure IV. 21 : Acquisition DL de la CFP exprimée en cellules Vero.	98
Figure IV. 22 : Spectre d'absorption (continu) et d'émission (pointillé) de la CFP.	99

Figure IV. 23 : Acquisition DL de la YFP exprimée en cellules Vero.	100
Table VI. 2 : Durées de vie des différents mutants YFP (mutations communes : S72A, T203Y).	101
Figure IV. 24 : Acquisition DL de la BFP exprimée en cellules Vero.	102
Figure IV. 25 : Comparaison du déclin de fluorescence de la BFP (noir) et du déclin de l'autofluorescence cellulaire (gris).	103
Figure IV. 26 : Acquisition DL de la DsRed exprimée en cellules Vero.	104
Figure IV. 27 : Comparaison des différents déclin de fluorescence des protéines autofluorescentes.	106
Table IV. 3 : Durées de vie des différentes XFP.	106
Table IV. 4 : Durées de vie de la GFP en fonction du temps après transfection.	108
Table IV. 5 : Durées de vie des protéines fusions GFP.	109
Figure IV. 28 : Couple de FRET BFP / GFP.	111
Figure IV. 29 : Couple de FRET CFP / YFP.	112
Figure IV. 30 : Couple de FRET GFP / DsRed.	113
Figure IV. 31 : Recouvrement spectral du couple GFP / DsRed.	113
Figure IV. 32 : Recouvrement spectral du couple GFP / GFP.	114
Table IV. 6 : Paramètres des déclin d'anisotropie de la GFP.	115
Figure IV. 33 : Déclin d'anisotropie de la GFP en solution et en cellules.	115
Table IV. 7 : Comparaison des temps de corrélation d'anisotropie de la GFP en solution.	117
Figure IV. 34 : Déclin de fluorescence de l'éthidium en solution seul ou en présence d'ADN.	119
Figure IV. 35 : Courbes expérimentales de déphasage et de démodulation de la fluorescence en fonction de la fréquence d'excitation.	120
Figure IV. 36 : Résultats des analyses globales par un modèle tri-exponentiel.	121
Figure IV. 37 : Résultat de l'analyse globale par un modèle à quatre exponentielles.	122
Figure IV. 38 : Modèle de l'interaction secondaire de l'éthidium à l'ARN de transfert.	123
Figure IV. 39 : Localisation subcellulaire la fluorescence de l'éthidium détectée en cellules vivantes.	125
Figure IV. 40 : Quantification de l'intensité de fluorescence de l'éthidium dans le noyau de cellules S2 en fonction de la concentration d'incubation.	126
Figure IV. 41 : Mise en évidence de l'intercalation de l'éthidium dans la chromatine de cellules S2 vivantes.	127
Figure IV. 42 : Déclin de fluorescence normalisés de l'éthidium provenant d'une solution d'ADN et du noyau de cellules vivantes.	127
Table IV. 8 : Paramètres cinétiques de la fluorescence de l'éthidium dans une solution d'ADN de phage et dans le noyau de cellules S2 vivantes.	128
Table IV. 9 : Quantification de l'éthidium libre et intercalé dans le noyau de cellules vivantes à différentes concentrations extracellulaires.	130
Figure IV. 43 : Perturbation du marquage nucléaire de l'éthidium par traitement à la digitonine.	132

Figure V. 1 : Schéma de l'interaction supposée entre GFP-p45 et DsRed-MafG.	136
Figure V. 2 : Acquisition DL de la fluorescence de la GFP provenant d'une cellule Hela co-exprimant GFP-p45 et DsRed-MafG.	138
Table V. 1 : Paramètres cinétiques de fluorescence de la GFP fusionnée ou non à p45 selon différentes conditions de transfection.	139
Figure V. 3 : Acquisition DL de la fluorescence de la GFP provenant de deux cellules Hela co-exprimant GFP-p45 et PC-DsRed.	141
Figure V. 4 : Analyse globale d'une acquisition DL de la fluorescence de la GFP provenant d'une cellule Hela co-exprimant GFP-p45 et PC-DsRed.	143
Figure V. 5 : Structure cristallographique du dimère de TK.	150
Figure V. 6 : Distribution subcellulaire de la fluorescence des XFP dans les cellules Vero exprimant les protéines TK ₃₆₆ -XFP.	152
Figure V. 7 : Acquisitions DL de la fluorescence de la CFP provenant de cellules Vero exprimant TK ₃₆₆ -CFP seule et co-exprimant TK ₃₆₆ -CFP et TK ₃₆₆ -YFP.	154
Table V. 2 : Paramètres cinétiques de fluorescence des mono et co-transfections TK ₃₆₆ -CFP et TK ₃₆₆ -YFP.	156
Figure V. 8 : Distribution subcellulaire de la fluorescence de la GFP dans les cellules Vero exprimant les protéines TK _n -GFP.	158
Table V. 3 : Paramètres cinétiques de déclin d'anisotropie de la TK ₂₇ -GFP, TK ₂₁₀ -GFP et TK ₃₆₆ -GFP en cellules vivantes, 24 heures post-transfection.	159
Figure V. 9 : Ajustement linéaire des temps de rotations des protéines TK _n -GFP en cellules vivantes en fonction de leurs poids moléculaires théoriques.	159
Figure V. 10 : Déclins d'anisotropie de fluorescence subcellulaire des protéines TK ₂₇ -GFP et TK ₃₆₆ -GFP.	160
Figure V. 11 : Différents déclins d'anisotropie de fluorescence des protéines TK ₂₁₀ -GFP et TK ₃₆₆ -GFP dans les cellules contenant (3 jours post-transfection) ou ne contenant pas d'agrégats fluorescents (un jour après transfection).	161
Table V. 4 : Paramètres physiques du transfert d'énergie entre chromophores GFP pour les dimères TK ₃₆₆ -GFP et TK ₂₁₀ -GFP en cellules vivantes.	164
Figure V. 12 : Modèle cinétique de la formation des dimères et des agrégats de TK ₃₆₆ -GFP.	168
Figure V. 13 : Structure cristallographique du nucléosome (d'après Arents et Moudrianakis, 1993).	170
Figure V. 14 : Déclins d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium nucléaire en cellules S2 vivantes.	173
Figure V. 15 : Simulation de "dip-and-rise" de déclin d'anisotropie.	174
Figure V. 16 : Déclins d'anisotropie et simulations de la fluorescence de l'éthidium intercalé dans le noyau de cellules S2 vivantes et dans l'ADN de phage .	175

Figure V. 17 : Modèle des sites d'intercalation de l'éthidium dans la chromatine de cellules proliférantes vivantes.	177
Figure V. 18 : Comparaison des déclin d'anisotropie de fluorescence de l'éthidium dans le noyau de neurones de rat en culture primaire et de cellules S2.	178
Figure V. 19 : Simulations par le modèle de Schurr avec $N = 20$ et $N = 100$.	179
Figure V. 20 : Modèle de la moindre restriction de dynamique torsionnelle de l'ADN par dissociation des protéines.	180